

Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, člen FEBS
a IUBMB

Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FChPT STU v Bratislave
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV
Občianske združenie Veda a život

DROBNICOV MEMORIÁL

8. ROČNÍK



**Horský hotel Smrekovica, Podsuchá,
23. – 25. september 2015**



Zborník príspevkov a program

**Redakčné úpravy
Boris Lakatoš**



prof. Ing. Ľudovít DROBNICA, DrSc.

DROBNICOV MEMORIÁL
8. ročník

23. – 25. september 2015

Horský hotel Smrekovica, Podsuchá

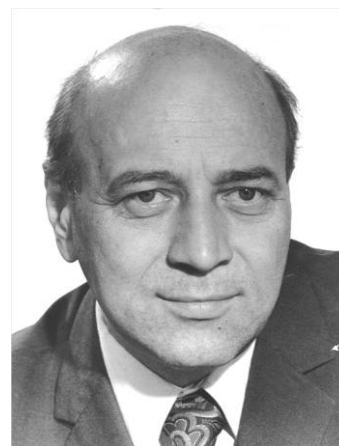
ISBN 978-80-970164-8-7

Redakčná úprava: doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.

Vydal: Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2015

Spomienka na prof. Ing. Ľudovíta Drobnicu, DrSc.

Narodil sa 30. septembra 1930 v Trnave. Po skončení vysokoškolského štúdia v Brne v roku 1953 nastúpil na Katedru technickej mikrobiológie a biochémie Chemickej fakulty Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave. Tu prešiel všetkými učiteľskými stupňami. Na fakulte patril medzi prvých vedeckých ašpirantov. Hodnosť kandidáta vied získal už v roku 1958. Docentom bol v odbore Biochémia a fyziológia mikroorganizmov od roku 1964. Vedeckú hodnosť doktora vied získal na Ústave organické chémie a biochémie v Prahe pre odbor Biochémia v roku



1973. Bohužiaľ, profesorom sa z politických dôvodov nestal ani do svojej predčasnej smrti v roku 1980 (napriek tomu, že vychoval viac než 100 diplomantov a viac než 20 ašpirantov). Bol ním menovaný po zmenách v roku 1989 in memoriam.

*Prof. Drobnica v rámci svojej nesmierne bohatej výskumnej činnosti založil, rozvinul a vybudoval na Slovensku vedeckú školu týkajúcu sa problematiky mechanizmu účinku prírodných a syntetických látok a vzťahov medzi ich štruktúrou, účinnosť určujúcimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami a biologickými aktivitami, a to s ohľadom na farmaceuticko-medicínske, poľnohospodársko-potravinárske i chemicko-ekologické aspekty použitia (aplikácie v praxi). Ťažisko jeho záujmu sa v tomto smere sústredilo na izotiokyanáty a ich prírodné prekurzory, predovšetkým glukozinoláty. Pod jeho vedením na stovkách prírodných i novosyntetizovaných derivátov boli študované chemické, biochemické i fyziologické parametre interakcií s enzýmami a inými izolovanými biokomponentami, subcelulárnymi partikulami, bunkovými i nadcelulárnymi modelmi a to tak z oblasti mikrobiálnej, rastlinnej, resp. živočíšnej ríše. Príslušné zistenia boli predmetom vyše 100 publikácií, 52 patentov, viac ako 200 vystúpení na vedeckých konferenciách, z nich viaceré prof. Drobnica ako medzinárodné organizoval u nás doma v Smoleniciach. Systematický výskum izotiokyanátov vyústil vydaním monografie *The Chemistry of –NCS group* vo vydavateľstve John Willey a zavedením p-brómfenyilizotiokynátu do výroby a využívania v praxi ako veterinárneho liečiva. Bohužiaľ z dôvodu predčasnej smrti sa mu už nepodarilo dokončiť a vydať monografiu *The biology of –NCS group*.*

Okrem izotiokyanátovej problematiky prof. Drobnica so svojimi kolegami a ašpirantami venoval pozornosť výskumu rôznych xenobiotík, regulácii energeticko-uhľikového metabolizmu, dimorfizmu kvasiniek, nadprodukcii primárnych metabolitov, imobilizovaným biosystémom, prežívaniu mikroorganizmov v nepriaznivých (stresových) podmienkach, atď.

Výsledkom týchto výskumných aktivít bola minimálne ďalšia stovka vedeckých prác v renomovaných časopisoch a mnohé ďalšie publikačné produkty. Spomínané témy sa stali základom celoživotného výskumu jeho žiakov, z ktorých mnohí sú významnými predstaviteľmi biochemických, mikrobiologických, fyziologických a biotechnologických vied nielen na Slovensku, ale aj vo svete.

Prof. Drobnica okrem pedagogickej a vedeckej práce pracoval aktívne v domácich a zahraničných vedeckých spoločnostiach, v odborných komisiách pre obhajoby dizertačných prác, vo vedeckých a edičných radách ústavov a vydavateľstiev, úzko spolupracoval s praxou. Popri tom bol v mladosti výkonným športovcom, perfektne hral šach, aktívne spieval, výborne hral na klavíri, bol veľmi spoločenský. Jeho veľkosť spočívala predovšetkým v excelentnej schopnosti rozvoja teoretických predstáv experimentálnymi cestami. Bol veľmi náročný na rozsah, hĺbku, kvantitu i kvalitu experimentálnej práce. Vyznačoval sa obrovskou neúnavnosťou a nadšením v laboratórnej činnosti, kritickým pohľadom k nameraným údajom a veľkou opatrnosťou pri formulovaní záverov. Významnou pre jeho prácu bola vysoká kooperativita. Spolupracoval s obrovským množstvom partnerov na svojom pracovisku, v rámci Bratislavy, Slovenska i na medzinárodnej úrovni. Perfektne vedel organizovať a vykonávať kolektívnu prácu. Okrem interdisciplinárneho prístupu k riešeniu vedecko-výskumných činností sa vyznačoval tiež schopnosťou prepájať vedu s praxou. Bol napríklad iniciátorom založenia Výskumného ústavu liečiv v Modre s prepojením na Slovakofarmu Hlohovec, zriadenia Enzýmovej poloprevádzky v Dolnej Krupej cez Výskumný ústav liehovarov a konzervární s nasmerovaním na biotechnologickú prax, atď.

Prof. Drobnica bol výnimočný tiež ako pedagóg. Vďaka svojej charismatickej osobnosti vedel zaujať každého poslucháča. Nikdy neľutoval čas strávený so študentmi a aspirantami. Majstrovsky vedel zapáliť záujem o vedu a nasmerovať dané schopnosti. Každého vedel povzbudiť, poradiť mu, pomôcť. Absolventi sa k nemu vracali dlho po skončení štúdia. Dodnes naňho spomínajú ako na nezabudnuteľný vzor pracovitosti a ľudskosti. Jeho vedecká škola má punc vysokej kvality. Veľmi dôležitou črtou jeho osobnosti bola nekonformnosť, nebojácnosť a schopnosť byť sebou samým. Tieto vlastnosti mu v časoch totality spôsobili nemálo ťažkostí i problémov a v konečnom dôsledku i predčasnú smrť. Až do nej však bol verný zásadám nezmieriteľnosti s pokrytectvom, povýšenectvom, aroganciou moci, obmedzovaním slobody a demokracie, päťolízachťvom. Typický pre neho bol pritom altruizmus, žičlivosť, optimizmus, pozitívne myslenie. V každom prípade však zmyslom i odkazom jeho života bola práca pre vedu a výchovu. Bola mu zdrojom potešenia pre seba a užitočnosti pre ostatných.

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

doc. Ing. Albert BREIER, DrSc.

PhDr. Zuzana KLIMEŠOVÁ

Ing. Andrej RUSNÁK, PhD.

Ing. Zdena SULOVÁ, DrSc.

doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.

Ing. Katarína TURÁKOVÁ, PhD.

Ing. Michal KALIŇÁK, PhD.

PRESEDA KOMISIE:

prof. MVDr. Juraj KOPPEL, DrSc.

ČLENOVIA KOMISIE:

RNDr. Mária BALÁŽOVÁ, PhD.

RNDr. Imrich BARÁK, DrSc.

doc. Ing. Albert BREIER, DrSc.

prof. RNDr. Peter FEDOROČKO, CSc.

doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.

prof. RNDr. Peter RAČAY, PhD.

RNDr. Ján SEDLÁK, DrSc.

Ing. Zdena SULOVÁ, DrSc.

prof. Ing. Peter ŠIMKO, DrSc.

Obsah

PROGRAM	9
ZBORNÍK PRÍSPEVKOV	13
SPONZORI DROBNICOVHO MEMORIÁLU	77

PROGRAM:

❖ 1. Deň: 23. 9. 2015 (streda)

12:00-14:00 Registrácia účastníkov

15:00-15:15 Otvorenie, Spomienka na doc. Ernesta Šturdíka

15:15-16:00 Plenárna prednáška: **Ján Sedlák: Bunková signalizácia a spriahnuté oscilátory**

16:00-16:15 PRESTÁVKA

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

Predseda: Peter Fedoročko, Zdena Sulová

16:15-16:30 Lucia Lapínová: Efekt antagonistu delta-opioidných receptorov naltrindolu na excitabilitu hipokampálnych neurónov z novonarodených potkanov

16:30-16:45 Marián Grman: Reakčný mechanizmus a biologické účinky produktov interakcie H₂S s S nitrózotiolmi

16:45-17:00 Stanislav Huszár: Mykobakteriálne proteíny WecA a Translokáza I – perspektívne ciele pre pôsobenie nových antituberkulotík

17:00-17:15 Lenka Tomášová: Efekt H₂S na HIF-1 α v THP-1 makrofágoch

17:15 – 17:30 PRESTÁVKA

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

Predseda: Albert Breier, Boris Lakatoš

17:30-17:45 Monika Buríková: Fotodynamická diagnostika tumoru pomocou transportného systému hypericín-LDL, štúdia na modeli CAM embrya prepelice japonskej

17:45-18:00 Barbora Kaločayová: Zmeny vlastností Na,K-ATPázy v mozgovej kôre potkana počas vývoja ochorenia Diabetes mellitus typu 1

18:00-18:15 Katarína Turáková: Znížená hladina UDP-glukózy je spojená so zvýšenou expresiou P-glykoproteínu v bunkách L1210 a limituje aktivitu glukozylceramid syntázy

18:15-18:30 Lucia Pavlíková: Vplyv exprese P-gp v leukemických bunkách na efekty inhibítora N-glykozylácie tunikamycínu

19:00 **VEČERA, neformálna diskusia**

❖ 2. Deň: 24. 9. 2015 (štvrtok)

8:00 - 9:20 **RAŇAJKY**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

predseda: Peter Račay, Imrich Barák

09:30-09:45 Zuzana Ježíková: Detoxifikačný fenomén ABC transportérov

09:45-10:00 Zuzana Kaňková: Účinok exogénneho zvýšenia maternálneho testosterónu na génovú expresiu prozápalových faktorov v závislosti od genetickej línie mláďat prepelíc japonských

10:00-10:15 Roman Moravčík: Vplyv PPAR α agonistu Wy-14,643 na akútny oxidačný stres indukovaný prozápalovým cytokínom IL-1 α u endotelových buniek

10:15-10:30 Lucia Messingerová: Bunkové línie MOLM-13 a SKM-1 rezistentné na azacytidín vykazujú cross-rezistenciu k substrátom P-glykoproteínu

10:30-10:45 Tomáš Pagáč: Interakcie *Trichoderma* sp. s fytopatogénmi a rastlinami

10:45-11:00 Ľudmila Hrehová: Nosia lastovičky len jar?

11:00-11:15 **PRESTÁVKA**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

Predseda: Mária Balážová, Juraj Koppel

11:15-11:30 Zuzana Pakanová: Štruktúrna analýza glykokonjugátov v medicínskej diagnostike

11:30-11:45 Lucia Toporová: Identifikácia a charakterizácia väzobných vlastností nukleárných retinoid X receptorov v pečeni potkana

11:45-12:00 Martina Cocuľová: Prítomnosť P-glykoproteínu v bunkách AML je spojená s expresiou nestínu, markera nervových kmeňových/progenitorových buniek

12:00-12:15 Ivana Pilchová: Rozdielny vplyv inhibície proteazómu na bunkové línie T98G a SH-SY5Y

12:15-12:30 Nina Kunová: Novel substrates for Lon-mediated proteolysis in mitochondria

12:30-12:45 Katarína Klačanová: Expresia proteínov Mfn2, DRP1 a VDAC1 pri ischemicko-reperfúznom poškodení mozgu

12:45-13:45 OBED

Sekcia III Enzymológia a proteomika

Predseda: Imrich Barák, Ján Sedlák

14:00-14:15 Andrea Kuchtová: *In silico* analýza amylomaltáz z rodiny GH77

14:15-14:30 Mária Martinovičová: *In silico* analýza glukán vetviacich enzýmov z alfa-amylázovej rodiny GH57

14:30-14:45 Matej Maťaša: Vplyv konidiácie na tvorbu proteolytických enzýmov u *Trichoderma* spp.

14:45-15:00 Kristína Kováčová: Transglykozylázy bunkových stien kvasiniek

15:00-15:30 PRESTÁVKA

Sekcia IV Biotechnológie

Predseda: Peter Šimko, Albert Breier

15:30-15:45 Ľudmila Kluková: Grafén ako inovatívny materiál využívaný pri príprave ultrasenzitívnych lektínových biosenzorov.

15:45-16:00 Štefan Belický: Včasná diagnostika rakoviny prostaty pomocou analýzy glykánov

16:00-16:15 Daniela Jamrichova: Optimalizácia produkcie rekombinantnej acetylesterázy CE16 z *Hypocrea jecorina* a jej bioinformatická analýza

16:15-16:30 András Hushegyi: Ultrasenzitívna detekcia glykán-proteínových interakcií pomocou glykánového biosenzora

16:30-16:45 Martina Zámorová: Optimalizácia postupu analýzy glykoproteínov pomocou glykánovej microarray využívajúcej lektíny

16:45-17:00 Alena Holazová: Studium glykosylačných zmien u nádorových onemocnění s pomocí microarray

19:00 VEČERA, neformálna diskusia, voľná zábava

❖ **3. Deň: 25. 9. 2015 (piatok)**

8:30-9:30 RAŇAJKY

POSTEROVÁ SEKCIA (9:30-10:15)

Predseda: Boris Lakatoš, Zdena Sulová

1. Katarína Dibdiaková: Analýza vplyvu CoCl_2 na ubikvitín-proteazomálny systém a hladinu expresie proteínov HSP70
2. Michal Híreš: Vývoj rýchlej a optimalizovanej metódy určenej pre mikrobiálnych producentov inhibítorov lipáz
3. Žofia Janštová: Vplyv materského stresu na kvalitu blastocýst izolovaných z matiek s rozdielnym obsahom telesného tuku
4. Jan Madacki: Nové aspekty v pôsobení karbamidových antimykobakteriálnych liečiv
5. Tomáš Molnár: *Trichoderma atroviride* a jej vzťah k Ca^{2+} iónom
6. Veronika Palušková: Sekundárny metabolizmus vo fyziológii *Trichoderma* sp.
7. Simona Saksonová: Štúdium neuroprotektívnych mechanizmov bielkovín tepelného šoku

10:15-11:30 **Zasadnutie komisie**

11:45-12:45 **Vyhlásenie výsledkov súťaže mladých vedeckých pracovníkov
a ukončenie 8.ročníka Drobnicovho memoriálu**

12:45-13:45 **OBED, Odchod z hotela**

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

Reakčný mechanizmus a biologické účinky produktov interakcie H₂S s S nitrózotiolmi

Marián Grman^{1,2}, Miriam M. Cortese-Krott³, Martin Feelisch⁴, Péter Nagy⁵, Andrea Berényiová⁶, Soňa Čačányiová⁶, Karol Ondriaš^{1,2}

¹ Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

² Molekulárno-medicínske centrum SAV, Vlárská 3-7, 831 01 Bratislava, Slovenská republika

³ Fakulta medicíny, Univerzita Heinricha Heineho v Düsseldorfe, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Nemecko

⁴ Fakulta medicíny, Univerzita v Southamptone, Tremona Road SO16 6YD, Southampton, Spojené kráľovstvo

⁵ Národný onkologický ústav, Ráth György utca 7-9, 1122 Budapešť, Maďarsko

⁶ Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika

Úvod:

Sírovodík (H₂S) a oxid dusnatý (NO) sú plynné signálne molekuly produkované endogénne v ľudskom organizme špecifickými enzýmami. Sú zahrnuté v regulácii mnohých (pato)fyziologických funkcií. Väzbou NO na tiolovú skupinu cysteínu vznikajú S-nitrózotiol, ktoré v bunkách predstavujú biorezervoár NO. Po ich interakcii s H₂S dochádza k uvoľneniu NO z tejto väzby a k tvorbe nových produktov – polysulfidov (HSx–), nitrózopersulfidu (SSNO–), dinitrózosulfitu (SULFI/NO) a nitroxylu (HNO) [1, 2]. Viacero štúdií poukazuje na vzájomné prepojenie NO a H₂S signálnych dráh. Napríklad aplikácia zmesi S nitrózo-N acetyl-DL penicilamínu (SNAP) a nadbytku H₂S vedie k vyššej aktivácii solubilnej guanylát cyklázy (sGC) v porovnaní s aplikáciou samotného SNAP [3]. Produkcia H₂S a NO je kolokalizovaná s TRPA1 kanálom, ktorý je aktivovaný molekulou HNO. Vazodilatačný efekt H₂S závisí od tvorby NO a od aktivácie HNO–TRPA1–CGRP signálnej dráhy [4].

Materiál a metódy:

Pomocou UV-VIS absorpčnej spektroskopie (HP 8452A Diode array spectrofotometer) sme študovali vplyv polysulfidov na kinetiku tvorby SSNO– ($\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$) vznikajúceho pri interakcii 2 mmol/L H₂S s 200 $\mu\text{mol/L}$ SNAP. Ako tlmivý roztok sme použili 200 mmol/L Tris/HCl + 100 $\mu\text{mol/L}$ DTPA, pH 7,4. Všetky zásobné roztoky boli pred použitím prebublané argónom. Pomocou metódy metylénovej modrej, studenej cyanolýzy a extrakcie elementárnej síry do chloroformu sme kvantifikovali množstvo SSNO– vytvoreného počas reakcie 500 $\mu\text{mol/L}$ SNAP s 5 mM H₂S. Biologický efekt – vplyv produktov interakčnej zmesi S nitrózoglutatiónu (GSNO) a H₂S na relaxáciu prúžkov aorty prekontrahovanej 1 $\mu\text{mol/L}$ fenylefrínom sme skúmali pomocou izometrickej tenzometrie.

Výsledky:

Pri reakcii H₂S so SNAP postupne dochádzalo k rozpadu SNAP a k narastaniu absorpcie pri ~270 nm (široký absorpčný pás zodpovedajúci HSx⁻) a pri 412 nm (SSNO⁻). Pridanie HSx⁻ do reakčného systému viedlo k vymiznutiu indukčnej periódy tvorby SSNO⁻ (zvýšila sa rýchlosť jeho tvorby), čo poukazuje na autokatalytický efekt HSx⁻.

SSNO⁻ vykazoval „rezistenciu“ voči bežne používaným redukčným agensom – DTT, KCN, GSH a Cys. SSNO⁻ sa v čase pomaly rozpadal, pričom jeho rozpad bol homolytický, vedúci k tvorbe NO• a SS•-. Pomocou metódy metylénovej modrej, studenej cyanolýzy a extrakcie elementárnej síry do chloroformu sme zistili, že množstvo vytvoreného SSNO⁻ predstavuje približne 25% a polysulfidov ~50% z koncentrácie SNAP.

Aplikácia interakčnej zmesi v koncentrácii 50/500, resp. 100/1000 nM GSNO/H₂S relaxovala fenylefrínom prekontraované prúžky hrudnej aorty niekoľkokrát rýchlejšie v porovnaní s účinkom samotného GSNO.

Záver:

Naše výsledky naznačujú, že produkt NO-H₂S interakcie, nitrózopersulfid, je jednak donorm NO, ale zároveň aj donorm sulfánovej síry, podobne ako vzniknuté polysulfidy a predstavuje tak prepojenie medzi H₂S a NO signálnou cestou. Experimenty jednoznačne ukázali, že produkty tejto interakcie majú biologické účinky, ktoré sú podobné účinkom NO.

Literatúra:

- [1] Cortese-Krott M.M. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2015, Vol.112(34):E4651-E4660.
- [2] Filipovic M.R. et al., J. Am. Chem. Soc., 2012, Vol.134(29):12016-12027.
- [3] Cortese-Krott M.M. et al., Redox Biol., 2014, Vol.2(1):234-244.
- [4] Eberhardt M. et al., Nature Communications, 2014, Vol.5: 4381.

Podakovanie: Práca bola podporená projektmi APVV 0074-11, VEGA/2/0019/15 a VEGA/2/0050/13.

Mykobakteriálne proteíny WecA a Translokáza I – perspektívne ciele pre pôsobenie nových antituberkulotík

Stanislav Huszár¹, Sophie Lagrange², Véronique Leblanc², Marina Protopopova³, Katarína Mikušová¹

¹ *Katedra Biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, 842 15 Bratislava, Slovensko*

² *Infectious Disease Therapeutic Strategic Unit, Sanofi-Aventis R&D, Toulouse, France*

³ *Sequella, Inc., 9610 Medical center Drive, Suite 200, Rockville, MD 20850, USA*

Tuberkulóza (TB) spôsobená baktériou *Mycobacterium tuberculosis* zostáva vo svete naďalej závažným zdravotníckym problémom¹. Šírenie rezistentných kmeňov tohto patogénu, vyvolávajújúcich mnohonásobne-rezistentnú (MDR-TB) a extenzívne-rezistentnú tuberkulózu (XDR-TB), zvyšuje vo svete potrebu nových antituberkulotík. Tie by mali spĺňať niekoľko kritérií vrátane vysokej účinnosti pre skrátenie súčasnej doby liečby, a tiež zasahovania nových cieľov pre terapiu MDR-TB a XDR-TB².

M. tuberculosis je z hľadiska liečby náročným patogénom v dôsledku výnimočnej stavby jeho bunkovej steny a jeho rôznych fyziologických stavov počas infekcie. Bunková stena, ktorej výstavba je blokovaná viacerými klinicky používanými antituberkulotikami, tak poskytuje široké spektrum možností pre hľadanie nových cieľov. Bakteriálna translokáza I (MraY, fosfo-MurNac-pentapeptid transferáza, MurX v *M. tuberculosis*) katalyzuje prvý membránový krok biosyntézy peptidoglykánú a je validovaným cieľom pôsobenia niekoľkých tried nukleozidových antibiotík ako sú tunikamycíny, lipozidomycíny, mureidomycíny, muraymycíny a kapuramycíny. Dve molekuly, pôvodne označované ako inhibítory translokázy I *M. tuberculosis* (SQ641, CPZEN-45), sú v súčasnosti v predklinickej fáze testovania. Nedávno bolo dokázané, že cieľom pôsobenia kaprazamycínového derivátu CPZEN-45 je mykobakteriálny proteín WecA³. WecA a translokáza I *M. tuberculosis* sú esenciálne enzýmy iniciujúce membránovo asociované kroky biosyntézy dvoch kľúčových štruktúr bunkovej steny – arabinogalaktánu a peptidoglykánú, a predstavujú tak atraktívne a doteraz nepreskúmané ciele pre vývoj nových antituberkulotík. WecA a MurX *M. tuberculosis* sú tunikamycín-senzitívne transferázy, odlišné deriváty liponukleozidových prírodných látok tak môžu zasahovať WecA a/alebo MurX s rôznou efektivitou.

S použitím enzýmových frakcií pripravených z mykobakteriálnych kmeňov *M. tuberculosis* H37Ra a *M. smegmatis* mc2155 sme sa pomocou radiometrických esejí zamerali na preskúmanie selektivity vybraných látok: kapuramycínového derivátu SQ641, jeho prirodzeného prekursora SQ997 a látky štruktúrne podobnej tunikamycínu - X-J99620886 voči mykobakteriálnym proteínom WecA a translokáze I. S cieľom preskúmať inhibičný efekt

vybraných látok na ľudskú GlcNAc-P transferázu sme uskutočnili esej v rovnakých podmienkach s membránovou frakciou izolovanou z ľudskej bunkovej línie MOLM-13. Taktiež sme otestovali a optimalizovali metódy stanovenia oboch mykobakteriálnych aktivít (WecA a translokázy I), ktoré môžu byť použité pre vysoko-účinný skrining inhibítorov týchto proteínov⁴. Pre bližšiu charakterizáciu mykobakteriálnych rekombinantných proteínov WecA a translokázy I v súčasnosti optimalizujeme ich produkciu a izoláciu.

Literatúra:

1. WHO (2013) Global Tuberculosis Report 2013
2. Zumla, A., Nahid, P. and Cole, S. (2013). Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(5): 388-404.
3. Ishizaki (2013) Ishizaki, Y., Hayashi, C., Inoue, K., Igarashi, M., Takahashi, Y., Pujari, V., Crick, D.C., Brennan, P.J. and Nomoto, A. (2013). Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase WecA, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. *J Biol Chem.* 288(42): 30309-19.
4. Hyland, S. A. and Anderson, M. S. (2003). A high-throughput solid-phase extraction assay capable of measuring diverse polyprenyl phosphate: sugar-1-phosphate transferases as exemplified by the WecA, MraY, and MurG proteins. *Anal Biochem.* 317(2): 156-65.

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom 7FP (Grant 260872, More Medicines for Tuberculosis, Katarína Mikušová), grantom APVV (DO7RP-0015-11, Katarína Mikušová) a grantom VEGA (1/0441/15, Katarína Mikušová). Podakovanie patrí naším spolupracovníkom zo Sanofi a Sequella za poskytnutie testovaných látok a Ing. Zdene Sulovej, DrSc. z Ústavu molekulárnej fyziológie a genetiky SAV za poskytnutie buniek MOLM-13.

Efekt antagonistu δ -opioidných receptorov naltrindolu na excitabilitu hipokampálnych neurónov z novonarodených potkanov

Lapínová Lucia¹, Dremencov Eliyahu^{1,2}, Lacinová Ľubica¹

¹ Slovenská akadémia vied, Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Vlárská 5, 833 34 Bratislava,

² Slovenská akadémia vied, Ústav experimentálnej endokrinológie, Vlárská 3, 833 06 Bratislava,

Úvod:

Hipokampus je mozgová štruktúra podieľajúca sa na procesoch učenia, pamäte a priestorovej navigácie. Je to oblasť mozgu, ktorá je zasiahnutá pri mnohých neurodegeneratívnych poruchách, ako sú Alzheimerova choroba, epilepsia temporálneho laloku, schizofrénia či depresia. Delta-opioidné receptory zohrávajú dôležitú úlohu v procesoch učenia a pamäte, chronickej bolesti, emočných procesoch a pri poruchách nálad. V hipokampe sú exprimované dva typy opioidných receptorov: vo vysokej koncentrácii δ -opioidné receptory, v nižšej koncentrácii μ -opioidné receptory [2]. Opioidné receptory majú vo všeobecnosti na neuronálnu excitabilitu inhibičný vplyv. Aktivácia δ -opioidných receptorov môže ovplyvniť excitabilitu pyramidálnych hipokampálnych neurónov priamo, prostredníctvom inhibície signálnej dráhy cAMP - adenylát cykláza - proteínkináza A [3] alebo nepriamo, prostredníctvom inhibície GABAergných interneurónov [4].

Materiál a metódy:

Z novorodených potkanov kmeňa Wistar bola pripravená primárna kultúra hipokampálnych neurónov modifikovaným postupom podľa Geier a kol. [1]. Akčné potenciály (AP), spontánna aktivita aj iónové prúdy boli merané metódou patch-clamp v konfigurácii „z celej bunky“ s použitím zosilňovača HEKA EPC-10. Evokovaná séria AP bola indukovaná 300 ms trvajúcimi depolarizačnými pulzmi z pokojového membránového potenciálu (V_{mem}) okolo -70 mV. Spontánna aktivita bola meraná z prirodzeného pokojového V_{mem} meranej bunky. Sodíkové prúdy boli merané depolarizačnými pulzmi na potenciáli od -90 mV do +70 mV a následne boli merané vápnikové prúdy na potenciáli od -40 mV do +50 mV. Mikropipety boli vyrobené z borosilikátového skla so vstupným odporom od 3.0 do 3.5 M Ω . Kapacita buniek sa pohybovala v rozmedzí od 14 do 60 pF. Naltrindol (NTI) bol aplikovaný do tesnej blízkosti meranej bunky perfúznym systémom. Pri meraní excitability boli použité štyri koncentrácie: 100 nM, 1 μ M, 10 μ M a 100 μ M. Pri meraní vápnikových a sodíkových prúdov sme sa zamerali na koncentráciu 10 μ M, ktorá mala najväčší účinok na generovanie AP.

Výsledky a diskusia:

Naltrindol v koncentráciách 1 μM , 10 μM a 100 μM signifikantne znížil počet AP v depolarizáciou-indukovanej sérii. Koncentrácia 100 nM nemala na generovanie evokovanej série AP žiadny efekt. Vyššie koncentrácie NTI (1 μM , 10 μM a 100 μM) signifikantne znížili aj spontánnu aktivitu hipokampálnych neurónov, zatiaľ čo nižšia koncentrácia (100 nM) spontánnu aktivitu potlačila iba mierne. Najvyšší účinok mala koncentrácia 10 μM NTI. Táto koncentrácia zároveň znižuje maximálnu amplitúdu vápnikových prúdov pretekajúcich cez vápnikové kanály exprimované v pyramidálnych hipokampálnych neurónoch, zatiaľ čo sodíkové kanály neboli ovplyvnené.

Záver:

Antagonista δ -opioidných receptorov naltrindol potláča evokované či spontánne generovanie akčných potenciálov pyramidálnych hipokampálnych neurónov izolovaných z novorodených potkanov, avšak bez inhibície sodíkových prúdov. K potlačeniu excitability pravdepodobne prispieva inhibícia vápnikových kanálov. Predpokladáme však, že k inhibícii aktivity prispievajú aj iné faktory, napríklad inhibícia draslíkových kanálov. Práve kvôli schopnosti ovplyvniť generovanie akčných potenciálov a inhibovať vápnikové kanály predstavujú δ -opioidné receptory potenciálny cieľ na liečbu ochorení centrálného nervového systému.

Literatúra:

- [1] Geier P., Lagler M., Boehm S., et al. (2011) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, p. C937
- [2] Lutz P.E., Kieffer B.L. (2013) *Trends Neurosci.* 36, p. 195
- [3] Nestler E.J., Aghajanian G.K. (1997) *Science* 278, p. 58
- [4] Niikura K., Narita M., Butelman E.R., et al. (2010) *Trends Pharmacol. Sci.* 31, p. 299

PodĎakovanie: Práca bola podporená grantom No.APVV 0212-10 (LL) a štipendiom SAS (ED). Ďakujeme Romanovi Moravčíkovi z KŽFE PRIF UK za pomoc pri optimalizácii metódy izolácie a kultivácie hipokampálnych neurónov.

Efekt H₂S na HIF-1 α v THP-1 makrofágoch

Tomášová Lenka^{2,3,4}, Mišák Anton^{1,5}, Laggner Hilde²

¹ Molekulárno-medicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Vlárská 7, 83101 Bratislava, Slovensko

² Centrum patobiochémie a genetiky, Oddelenie medicínskej chémie a patobiochémie, Univerzita medicíny, Währingerstrasse 10, 1090 Viedeň, Rakúsko

³ Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 83232 Bratislava, Slovensko

⁴ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Vlárská 5, 83334 Bratislava, Slovensko

⁵ Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84505, Bratislava, Slovensko

Úvod:

Sírovodík (H₂S) sa v súčasnosti zaraďuje popri oxide dusnatom a oxide uhoľnatom do skupiny plyných transmitterov. Je endogénne produkovaný v tkanivách cicavcov a má špecifické biologické účinky. Jeho protizápalové a antioxidantné vlastnosti sú jedným z navrhovaných molekulárnych mechanizmov, avšak signálna dráha v bunkách je zatiaľ nejasná [1]. Zápalový proces v bunkách modulujú dve redox-senzitívne signálne dráhy: NF κ B (nuclear factor- κ B) a Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) [2]. Aktivácia NF κ B cesty vedie k expresii prozápalových cytokínov. Naopak aktivácia Nrf2 cesty predstavuje hlavnú antioxidantnú obranu buniek. Obe cesty dokážu aktivovať transkripčný faktor HIF 1 α (hypoxia inducible factor 1 α) [3, 4]. Cieľom našej štúdie bolo preskúmať vplyv H₂S na transkripčné faktory HIF 1 α , Nrf2 a p65, ktorý je kľúčovým pri aktivácii NF κ B cesty.

Materiál a metódy:

Bunkovú líniu ľudských THP 1 makrofágov sme inkubovali 6 a 24 hodín so H₂S, ktorý bol postupne uvoľňovaný z pomalého donora GYY4137 a/alebo s inhibítorom p38 MAPK (p38 mitogen activated protein kinase) SB203580. Proteíny z frakcie cytozolu a jadra makrofágov sme separovali SDS polyakrylamidovou elektroforézou a následne preniesli na nitrózocelulózovú membránu, ktorú sme inkubovali cez noc pri 4°C s primárnymi protilátkami anti HIF 1 α , anti Nrf2, anti p65 a anti phospho p65 (Ser536), anti β Aktinom a anti Laminom B1.

Výsledky:

H₂S uvoľnený z pomalého donora GYY4137 podporuje akumuláciu HIF 1 α a Nrf2 proteínov v jadre THP 1 makrofágov. Tento efekt je čiastočne zrušený inhibítorom p38 MAPK SB203580. Na druhú stranu H₂S znižuje fosforyláciu p65 proteínu.

Záver:

H₂S indukovaná akumulácia HIF-1 α v THP-1 makrofágoch nie je vyvolaná aktiváciou prozápalovej NF κ B cesty. Predpokladáme, že táto akumulácia je súčasťou antioxidantnej Nrf2 cesty a p38 MAPK je jedným z enzýmov, prostredníctvom ktorého H₂S túto cestu aktivuje [5].

Literatúra:

1. Wang, R., Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 2012. 92(2): p. 791-896.
2. Bellezza, I., et al., Nrf2 and NF-kappaB and Their Concerted Modulation in Cancer Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)*, 2010. 2(2): p. 483-97.
3. Gorlach, A. and S. Bonello, The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J*, 2008. 412(3): p. e17-9.
4. Ji, X., et al., Knockdown of Nrf2 suppresses glioblastoma angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1alpha. *Int J Cancer*, 2014. 135(3): p. 574-84.
5. Lohninger, L., et al., Hydrogen sulphide induces HIF-1alpha and Nrf2 in THP-1 macrophages. *Biochimie*, 2015. 112: p. 187-95.

Podakovanie: Táto štúdia bola podporená Ernst-Machovým štipendiom OeAD, Grant No. ICM-2013-05839, grantovými agentúrami APVV (Grant No. APVV-0074-11) a VEGA (Grant No. VEGA/2/0019/15).

Detoxikačný fenomén ABC transportérov

Zuzana Ježíková, Tomáš Pagáč, Petra Olejníková, Svetlana Kryštofová

Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Transportéry typu ABC tvoria rozšírenú skupinu proteínov, ktoré sú prítomné vo všetkých živých organizmoch. Tieto proteíny využívajú energiu z hydrolýzy ATP, a tak dokážu transportovať rôzne druhy substrátov cez biologickú membránu. Spomedzi mechanizmov rezistencie voči antifungálnym látkam a fungicídum sú efluxné pumpy často zodpovedné za mnoholiekovú rezistenciu.

Z hľadiska štruktúry obsahujú všetky ABC proteíny dve NBD (nucleotide-binding domain), ktoré viažu a hydrolyzujú molekulu ATP. Tie sú v rámci transportérov situované v membráne na cytoplazmovej strane. Rovnako obsahujú aj dve transmembránové domény (TMD), ktoré vytvárajú kanál cez membránu [1]. V eukaryotických bunkách sa tieto proteíny exprimujú buď vo forme jedného polypeptidu zahŕňajúceho dve NBD a dve TMD, alebo ako polovičné transportéry s jednou NBD a jednou TMD doménou, ktoré vytvárajú homo- alebo heterodimér ako funkčný ABC transportér.

Trichoderma spp. je známa svojou rezistenciou voči množstvu toxických a xenobiotických zlúčenín. Rezistencia zahŕňa antibiotiká produkované inými mikroorganizmami, antimikrobiálne zlúčeniny rastlín, ako aj chemické fungicídy [2]. Táto významná vlastnosť sa pripisuje objaveniu génov kódujúcich ABC transportéry. Nadmerná expresia génov transportérov totiž znižuje akumuláciu toxických látok vo fungálnych bunkách.

V súčasnosti je preštudovaný iba jeden gén kódujúci ABC transportér v genóme *Trichoderma atroviride*, Taabc2. Preto sú tieto transportéry v centre vedeckého záujmu. Cieľom tejto práce je študovať úlohu ABC transportérov v detoxikácii *Trichoderma* spp.. Ide hlavne o antifungálne látky aplikované v medicíne, organické kyseliny používané v potravinárskom priemysle a fungicídy, ktoré sa využívajú v poľnohospodárstve. Ďalšou stratégiou na základe sledovania citlivostí a expresných profilov génov jednotlivých ABC transportérov je postupná príprava delečného mutantu Taabc4, ako aj jeho heterológna expresia v Δ Pdr5 a Δ Pdr12 *S. cerevisiae*.

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že *Trichoderma atroviride* dokáže v porovnaní s ostatnými modelovými vláknitými hubami najefektívnejšie odolávať testovaným zlúčeninám. To korešponduje s tvrdením, že táto mikromycéta je primárne rezistentná voči množstvu chemických zlúčenín, sekundárnych metabolitov, organických kyselín,

antifungálnych látok či fungicídov. Táto jej vlastnosť je významná z hľadiska biologickej ochrany rastlín. Porovnaním citlivostí modelových vláknitých húb v prítomnosti antifungálnych látok sa potvrdila rezistencia *T. atroviride* najmä voči flukonazolu, cyklosporínu a cykloheximidu a znížená citlivosť na amfotericín B a terbinafín. Čo sa týka látok používaných v konzervárskom priemysle, vláknitá huba je odolná voči všetkým testovaným organickým kyselinám. V prípade poľnohospodárskych fungicídov sa pozorovala rezistencia najmä voči dichlóranu a mankozebu. Týmto tvrdeniam zodpovedajú aj expresné profily génov jednotlivých transportérov.

Literatúra:

- [1] Higgins, C. F. Res. Microbiol. 2001, 152, 205-210.
- [2] Harman, G. E.; Latorre, B.; Agosin, E.; San Martin, R.; Riegel, D. G.; Nielsen, P. A.; Tronsmo, A.; Pearson, R. C. Biol. Control. 1996, 7(3), 259-266.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla s finančnou podporou grantových agentúr APVV v rámci riešenia projektu APVV-0282-10 a VEGA1/0870/14.

Zmeny vlastností Na,K-ATPázy v mozgovej kôre potkana počas vývoja ochorenia Diabetes mellitus typu 1.

Kaločayová Barbora, Mézešová Lucia, Barteková Monika, Vlkovičová Jana, Jendruchová Veronika, Vrbjar Norbert

Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava 45, Slovensko

Predložená práca je zameraná na štúdium vlastností Na,K-ATPázy, kľúčového systému pri udržiavaní vnútrobunkovej koncentrácie sodíka za fyziologických i patofyziologických podmienok. Nadväzujeme na predchádzajúce štúdie, ktoré poukázali na zmeny iónového transportu v organizme počas Diabetes mellitus typu 1 (DM1). V našich experimentoch sme sa zamerali na charakterizáciu ATP- a Na-väzbových miest a expresiu katalytických alfa podjednotiek tohto enzýmu. Vzorky sme odoberali z mozgovej kôry potkanov kmeňa Wistar oboch pohlaví po akútnom (8 dňovom) a chronickom (16 týždňovom) trvaní DM1. Ochorenie sme indukovali jednorazovým intraperitoneálnym podaním streptozotocínu v dávke 65 mg.kg⁻¹. Pri štúdiu akútneho DM1 Western blot analýzou sme pre alfa1 podjednotku u samíc zistili mierny pokles expresie proteínu, kým pre alfa2 a alfa3 podjednotky sme nezistili štatisticky významné zmeny ani u jedného pohlavia. Kinetické merania aktivity enzýmu poukazujú na nezmenený počet aktívnych molekúl všetkých troch podjednotiek Na,K-ATPázy, čo dosvedčuje nezmenená hodnota V_{max} u oboch pohlaví. Zaujímavosťou ale je pokles tohto parametra u diabetických samíc v porovnaní s diabetickými samcami. Čo sa týka kvalitatívnych vlastností enzýmu, zaznamenali sme medzipohlavný rozdiel v zhoršenej schopnosti viazať ATP, ako na to poukazuje zvýšená hodnota K_m u samíc v porovnaní so samcami bez ohľadu na fyziologický stav. Pri štúdiu chronického DM1 Western blot analýzou sme nezistili štatisticky významné zmeny v expresii alfa podjednotiek ani u jedného pohlavia. Pri aktivácii Na,K-ATPázy z mozgovej kôry substrátom ATP in vitro sme pozorovali stabilitu enzýmovej aktivity v reakcii na chronické pôsobenie diabetu u oboch pohlaví potkanov. Avšak, pri sledovaní vlastností enzýmu z hľadiska pohlavnej diferenciácie sme zistili významné zvýšenie aktivity Na,K-ATPázy u samíc bez ohľadu na ich fyziologický stav v porovnaní so samcami. Podobný trend nastal aj pri aktivácii enzýmu s narastajúcimi koncentraciami kofaktora Na⁺. Pri oboch typoch aktivácie sme pozorovali vyšší počet aktívnych molekúl u samíc v porovnaní so samcami u kontrolných ako aj u diabetických potkanov, ako to naznačuje zvýšenie hodnoty V_{max}. Naše výsledky poukazujú na odolnosť Na,K-ATPázy voči komplikáciám spôsobených počas vývoja DM1. Enzým tak môže

udržiavať vnútrobunkovú homeostázu sodíka v bunkách mozgovej kôry bez výraznejších zmien i počas ochorenia DM1.

PodĎakovanie: Práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA: 2/0141/13.

Fotodynamická diagnostika tumoru pomocou transportného systému hypericín-LDL, štúdia na modeli CAM embrya prepelice japonskej.

Buríková Monika¹, Bilčík Boris¹, Máčajová Mariana¹, Bizík Jozef², Mateašík Anton³, Čavarga Ivan⁴

¹ Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko

² Ústav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská 7, 833 91 Bratislava 37, Slovensko

³ Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 841 04 Bratislava 4, Slovensko

⁴ Onkologický ústav sv. Alžbety, s.r.o., Heydukova 10, 812 50 Bratislava, Slovensko

Úvod:

Vo fotodynamickej diagnostike (PDD) sa prioritne využívajú špecifické fluorescenčné vlastnosti fotosenzibilizátorov (PS) s cieľom detekcie nádorových ložísk [1]. Využitie transportných nosičov umožňuje zvýšiť akumuláciu PS v nádorovom tkanive. Nepolárne jadro lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) predstavuje vhodný priestor pre lipofilné PS a chráni ich tak pred redistribúciou v priebehu transportu [2]. V našich experimentoch sme ako PS použili hypericín (Hyp), prírodný extrakt z rastliny *Hypericum perforatum*, ktorý má relatívne vysoký kvantový zisk fluorescencie a nízke fotodegradačné charakteristiky [3]. Ako experimentálny model sme použili chorioalantoickú membránu (CAM) embrya prepelice japonskej (*Coturnix japonica*). CAM je tenké a transparentné tkanivo prestúpené hustou vaskulárnou sieťou, preto je výborným modelom pre štúdium nádorovej angiogenézy a testovanie PDD. Cieľom našej štúdie bolo ocharakterizovať fluorescenčnú kinetiku Hyp a Hyp:LDL komplexu na CAM s implantovanými nádorovými bunkami skvamocelulárneho karcinóm pažeráka (TE1).

Materiál a metódy:

Absorpčné a emisné spektrum jednotlivých formulácií Hyp boli merané fluorescenčnou spektroskopiou ($\lambda_{exc} = 540$ nm, $\lambda_{emis} = 575$ nm). Merané roztoky boli v rovnakej koncentrácii ako sa aplikovali na povrch CAM (Hyp a Hyp:LDL (100:1 a 200:1), v dávke 2 μ g/g embrya = 79 μ M v PBS s 0,17% DMSO). Od 3 vývojového dňa (ED3) boli embryá kultivované v 6-jamkových kultivačných platničkách. Na ED7 sme simulovali povrchovú infiltráciu tkaniva CAM pomocou implantovaných ľudských nádorových buniek skvamocelulárneho karcinómu pažeráka (TE1) vo forme sféroidov. Na ED8 sa následne na povrch CAM aplikovali jednotlivé formulácie Hyp (Hyp, komplex Hyp:LDL v pomere 100:1 a 200:1). Po excitácii tkaniva modrým svetlom LED (405 nm) sme v hodinových intervaloch zaznamenávali intenzitu fluorescencie Hyp. Hodnoty sme vyhodnocovali v červenom spektrálnom pásme

fluorescenčného obrazu. Na ED11 sme CAM so sféroidmi odseparovali od embrya, zařixovali a pripravili na histologické spracovanie (farbenie HaE).

Výsledky:

Fluorescenčná spektroskopia ukázala veľmi nízku intenzitu emisného spektra Hyp, čo signalizuje agregovaný stav molekuly. Intenzívnejšia fluorescencia komplexu Hyp:LDL dokumentuje vyšší stupeň monomerizácie molekuly, preto je tento transportný systém výhodný pre PDD. Lokalizácia sféroidov na CAM v bielom svetle bola problematická, ale voľný Hyp a komplex Hyp:LDL vo fluorescenčnom obraze veľmi dobre vizualizoval nádorové ložisko. Najväčší rozdiel intenzity fluorescencie medzi zdravým a nádorovým tkanivom sme zaznamenali pri komplexe Hyp:LDL 100:1 a 200:1. Potenciácia farmakokinetiky Hyp v komplexe s LDL môže byť podmienená väzbou na vyšší počet LDL-receptorov v nádorových bunkách. Histomorfológia tkaniva CAM s adherovanými sféroidmi potvrdila vitalitu nádorového tkaniva 5 dní po implantácii.

Záver:

Experimentálne výsledky ukazujú silnú fluorescenčnú aktivitu Hyp v komplexe s LDL hneď po aplikácii na rozdiel od samotného Hyp, čo je veľkou výhodou z diagnostického hľadiska. Rozdiel intenzity fluorescencie medzi zdravým a nádorovým tkanivom je tiež výraznejší pri komplexe Hyp s LDL. Transportný systém LDL potenciuje farmakokinetiku Hyp v tkanive TE1 tumoru a preto predstavuje vhodný model pre optimalizáciu PDD nádorových ochorení.

Literatúra:

- [1] Olivo M., Bhuvanewari R., Keogh I. (2011) *Pharmaceutics* 3(3), p. 354
- [2] Kascakova S., Nadova Z., Mateasik A., et al. (2008) *Photochem. Photobiol.*, 84(1), p.120
- [3] Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K. (2006) *Curr Med Chem.*, 13(18), p. 2189
- [4] Mikes J., Hyzdalova M., Koci L., et al. (2011) *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10(4), p. 626

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom APVV-0242-11 a VEGA 2/0102/15.

Vplyv expresie P-gp v leukemických bunkách na efekt inhibítora N-glykozylácie tunikamycínu.

Lucia Pavlíková¹, Mário Šereš¹, Ivana Ševčíková¹, Albert Breier^{1,2}, Zdena Sulová¹

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenska akadémia vied, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

² Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FChPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Viacieková rezistencia (MDR) je závažným problémom pri liečbe leukemických ochorení. Neoplastické bunky sa stávajú rezistentné na širokú škálu podávaných cytostatík. Najštudovanejším mechanizmom vzniku MDR je expresia transportných proteínov z rodiny ABC transportérov, ktorej členom je aj nami študovaný P-glykoproteín (P-gp). P-gp je syntetizovaný ako 140 kDa prekursor a svoju konečnú molekulovú hmotnosť 170 kDa získava glykozyláciou. Expresia P-gp v bunkách vyvoláva rad zmien v mnohých regulačných procesoch a dochádza aj k prestavbe povrchových sacharidov. V tejto práci sme sledovali vplyv inhibítora N-glykozylácie tunikamicínu na P-gp pozitívne a P-gp negatívne leukemické bunky. Expresiu P-gp v myšej leukemickej línii L1210 sme získali postupnou adaptáciou parentálnych buniek na vinkristín (R bunky) a T bunky, ktoré boli pripravené transfekciou materskej línie plazmidom obsahujúcim gén kódujúci ľudský P-gp. V ľudských leukemických líniiach SKM-1 a MOLM-13 došlo k expresii P-gp adaptáciou senzitivných buniek na vinkristín. Aj myšie aj ľudské leukemické bunky exprimujúce P-gp sú rezistentné aj na tunikamicín. V parentálnych líniiach sme v prítomnosti tunikamicínu pozorovali výrazný nárast apoptózy už po 24 h. Všetky rezistentné bunkové línie preživali aj opakované kultivácie v prítomnosti tunikamicínu, bunky v týchto podmienkach výrazne aglutinovali, ale nebola ovplyvnená ich viabilita.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená: grantom APVV 14-0334 a VEGA 2/0100/12; 2/0182/13. Projekt ŠF Development of Competence Centre for research and development in molecular medicine“ ITMS 26240220071.

Vplyv PPAR α agonistu Wy-14,643 na akútny oxidačný stres indukovaný prozápalovým cytokínom IL-1 α u endotelových buniek

Roman Moravčík¹, Monika Okuliarová¹, Dorota Kavická², Sofia Pastíriková¹, Michal Zeman¹

¹ *Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Ilkovičova 6, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovensko*

² *Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, Šafárikovo námestie 6, 814 99 Bratislava 1, Slovensko*

Reaktívne formy kyslíka (ROS), akými sú napríklad superoxidový anión, peroxid vodíka alebo peroxynitrit, môžu u endotelových buniek pôsobiť ako signálne molekuly a regulovať vaskulárny tonus, citlivosť na kyslík, proliferáciu, ale aj zápalové procesy. Narastajúci oxidačný stres ovplyvňuje aj viacero signálnych dráh, ktoré môžu následne narušiť génovú expresiu prostredníctvom modulácie viacerých transkripčných faktorov, vrátane peroxizómovým proliferátorom aktivovaného receptora (PPAR). Regulácia redoxnej homeostázy je preto dôležitým faktorom pre udržanie normálnych funkcií buniek. Dôkazy podporujúce úlohu PPAR α pri regulácii redoxnej signalizácie sú zatiaľ nedostatočné. Preto bolo cieľom našej práce stanoviť účinok PPAR α agonistu Wy-14,643 na akútny oxidačný stres vyvolaný prozápalovým cytokínom interleukínom-1 α (IL-1 α) v endotelových bunkách izolovaných z vény ľudského pupočníka (HUVEC) a zistiť možné mechanizmy, ktorými Wy-14,643 pôsobí. Mieru oxidačného stresu u HUVEC buniek sme stanovili pomocou prietokovej cytometrie použitím 2',7'-dichlorodihydrofluoresceín diacetátu (H2-DCF-DA). Expresiu mRNA pre hémoxigenázu-1 (HO-1) a transkripčný faktor Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) sme stanovili pomocou real time PCR. V prítomnosti IL-1 α (5ng/ml) sa významne zvýšilo množstvo ROS v HUVEC bunkách, pričom Wy-14,643 v koncentrácii 100 μ M a 10 μ M ich množstvo významne znížil. Podobné pôsobenie Wy-14,643 sme zaznamenali aj pri bunkách neovplyvnených IL-1 α . Real time PCR odhalila zvýšenie expresie HO-1 len v bunkách ovplyvnených Wy-14,643 v koncentrácii 100 μ M. Expresia transkripčného faktoru Nrf2 bola významne zvýšená len v prítomnosti IL-1 α . Antioxidačný účinok Wy-14,643 je

pravdepodobne spôsobený jeho priamym pôsobením na expresiu HO-1, ako aj prostredníctvom aktivácie transkripčného faktora Nrf2, ktorého expresia signifikantne vzrástla u všetkých HUVEC buniek ovplyvnených IL-1 α . Naše výsledky naznačujú výrazne pozitívne účinky agonistov PPAR α na úrovni cievneho endotelu, ktoré môžu mať fyziologický význam najmä v podmienkach subklinického a chronického zápalu.

Podakovanie: Tento článok/publikácia vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre dopytovo-orientovaný projekt: Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, ITMS 26240220086 spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantu APVV-0291-12.

Bunkové línie MOLM-13 a SKM-1 rezistentné na azacytidín vykazujú cross-rezistenciu k substrátom P-glykoproteínu

Lucia Messingerová^{1,2}, Denisa Imrichová¹, Helena Kavcová¹, Albert Breier^{1,2}, Zdena Sulová¹

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava

² Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave

Do skupiny látok s hypometylačným účinkom, ktoré sa používajú pri liečbe myelodysplastického syndrómu a akútnej myeloidnej leukémie (AML) patrí aj Azacytidín (Aza). Napriek tomu, že účinnosť Aza v liečbe pacientov s MDS a AML bola preukázaná, u niektorých pacientov sa počas liečby azacytidínom vyvinie rezistencia (Fenaux et al, 2009, Fenaux et al, 2010). Presné mechanizmy vzniku primárnej ani sekundárnej rezistencie na toto liečivo nie sú dodnes úplne objasnené a pozornosť je venovaná molekulárnym štúdiám tohto fenoménu na leukemických bunkových líniách s Aza navodenou rezistenciou.

Cieľom tejto štúdie bola analýza fenotypu Aza rezistentných bunkových línií SKM-1 a MOLM-13.

V štúdií boli používané dve bunkové línie akútnej myeloidnej leukémie SKM-1 a MOLM-13, ktoré sú odvodené od pacientov s AML, ktorej predchádzal MDS. Bunkové línie boli po dobu 6 mesiacov opakovane kultivované v médiu so zvyšujúcou sa koncentráciou Aza.

6-mesačná kultivácia bunkových línií SKM-1 a MOLM-13 v médiu so zvyšujúcou sa koncentráciou Aza, viedla k vzniku Aza rezistentných sublínií (SKM-1 / Aza a MOLM-13 / Aza), ktoré preživali aj v médiu obsahujúcom 5 $\mu\text{mol/l}$ Aza. Azacytidín nepredstavuje substrát P-glykoproteínu (P-gp) avšak postupná adaptácia týchto bunkových línií mala za následok indukciu expresie/aktivity P-gp, a zároveň tieto bunkové línie vykazujú cross-rezistenciu voči liečivám predstavujúcim substráty pre tento transportér, ktorá môže byť zvrátená verapamilom (inhibítorom P-gp). Kým rezistenciu voči substrátom P-gp v rezistentných sublíniách bolo možné zvrátiť pomocou inhibítorov P-gp rezistencia voči Aza ostala nezmenená. V rezistentných sublíniách sme sledovali tiež down-reguláciu NF-kappaB a antiapoptotických proteínov Bcl-2 a up-reguláciu proapoptotických proteínov Bax a p53 v porovnaní so senzitívnymi bunkovými líniami. V rezistentných

sublínách sme tiež pozorovali minimálne 5x zvýšenú aktivitu glutatión-S-transferázy, ktorá bola meraná pomocou 1-chlór-2, 5-dinitrobenzénu.

Dáta z tejto štúdie poukazujú na fakt, že dlhodobá aplikácia Aza môže viesť k vzniku drug-rezistentného fenotypu s integráciou rôznych mechanizmov, ktoré spôsobujú rezistenciu ako na samotný Aza tak aj voči širokému spektru liečiv, ktoré predstavujú substráty P-gp a GST.

PodĎakovanie: Práca bola podporená: APVV (APVV-14-0334; APVV-0160-11) a VEGA (Vega 2/0182/13; 2/0028/15).

Interakcie *Trichoderma* sp. s fytopatogénmi a rastlinami

Tomáš Pagáč, Barbora Ďurišová, Zuzana Ježíková, Petra Olejníková, Svetlana Kryštofová

Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Vláknité huby rodu *Trichoderma* sú vysoko odolné mikroorganizmy známe svojou schopnosťou atakovať fytopatogénne huby, ako aj kolonizovať koreňovú sústavu rastlín. Produkujú rôzne metabolity, ktoré vyvolávajú lokálne alebo systémové obranné reakcie rastliny počas napadnutia patogénom. Vďaka týmto svojím vlastnostiam predstavujú huby rodu *Trichoderma* hlavnú líniu biologických ochranných prostriedkov využívaných v poľnohospodárstve.

Kyselina indol-3-octová (IAA) patrí medzi sekundárne metabolity produkované *Trichoderma* sp. a zároveň plní úlohu signálnej molekuly v rastlinách.

Trichoderma atroviride vykázala mykoparazitickú aktivitu voči fytopatogénom *A. alternata* a *B. cinerea*. Pri priamom fyzickom kontakte húb došlo k výraznému prejavu mykoparazitickej aktivity. V oboch prípadoch sa prejavila schopnosť *T. atroviride* úplne kolonizovať a prerastať fytopatogénne mikromycéty *A. alternata* a *B. cinerea*. Intenzita konidiácie bola v mieste prerastenia kolónie fytopatogéna *A. alternata* a *B. cinerea* porovnateľná (1.105 konidií/cm²). Cídný efekt *T. atroviride* sa prejavil u oboch fytopatogénov.

Počas konfrontácie dochádza k produkcii toxických metabolitov, ktoré produkuje ako *Trichoderma* sp., tak aj fytopatogény. *Trichoderma* sp. sa dokáže voči týmto metabolitom brániť indukciou expresie efluxných púmp, ABC transportérov, ktoré predstavujú účinný systém detoxifikácie. Expresia génov *Taabc2-Taabc9* sa sledovala v prítomnosti bunkových stien a inaktivovaného mycélia fytopatogénov, ako aj pri priamej konfrontácii *Trichoderma* sp. s fytopatogénmi.

Bunkové steny fytopatogénov sa prejavili ako silné induktory expresie fungálnych ABC transportérov *Taabc2-Taabc9*. Miera expresie sledovaných génov pri priamych mykoparazitických interakciách *T. atroviride* a fytopatogénov *B. cinerea* a *A. alternata* sa menila v závislosti od štádia, v ktorom sa *T. atroviride* a fytopatogénna huba nachádzajú a druhu fytopatogéna.

Vláknité huby rodu *Trichoderma* vykazujú nielen výraznú mykoparazitickú aktivitu voči fytopatogénom, ale zároveň majú pozitívny vplyv na rast rastlín. Tento vplyv sa sledoval na modelovej rastline *Lepidum sativum*. Počas kultivácie modelovej rastliny *Lepidum sativum* v prítomnosti *Trichoderma* sp. došlo k zmene fenotypu rastliny – skrátenie hlavného koreňa,

zvýšenie množstva bočných koreňov, zníženie hmotnosti a výšky nadzemnej časti rastliny, čo zodpovedá vplyvu IAA na rast ratlín. Pôsobenie IAA na *Trichoderma* sp. ukázalo, že IAA pôsobí na rast vláknitej húby inhibične od 50 µg/ml.

Za účelom naznačiť možnú biosyntetickú dráhu IAA sa sledovala produkcia IAA počas kultivácie vláknitých húb s prídavkom tryptofánu (prekurzor syntézy IAA). Detekovateľné množstvo IAA sa zaznamenalo po 3 týždňoch kultivácie v prítomnosti tryptofánu. Bez prídavku exogénneho tryptofánu do živného média sa produkcia IAA nedetegovala.

Indukcia expresie génov transamináz TAM (149, 299 a 455), ktoré boli navrhnuté ako homológy génu ARO8 (transamináza biosyntetickej dráhy IAA) *S. cerevisiae*, sa sledovala po pridaní exogénneho tryptofánu do živného média. Nízka hladina tryptofánu (1 µg/ml) indukovala expresiu génu TAM455 vo zvýšenej miere, naopak, vysoká hladina tryptofánu (100 µg/ml) neindukovala expresiu TAM génov *Trichoderma* sp.

Podakovanie: Táto práca vznikla s podporou grantu VEGA1/0870/14.

Znížená hladina UDP-glukózy je spojená so zvýšenou expresiou P-glykoproteínu v bunkách L1210 a limituje aktivitu glukozylceramid syntázy

Katarína Turáková¹, Lucia Pavlíková², Lucia Messingerová^{1,2}, Boris Lakatoš¹, Albert Breier^{1,2}, Zdena Sulová²

¹Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37, Bratislava

²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Vlárská 5, 833 34, Bratislava

Expresia P-glykoproteínu (Pgp), člena rodiny ABC transportérov, ktorý pôsobí ako efluxná pumpa, spôsobuje v neoplastických bunkách ich zníženú citlivosť voči viacerým cytotoxickým látkam a je najčastejšou príčinou vzniku viaciekovej rezistencie. Viacero dôkazov naznačuje, že expresia Pgp je často sprevádzaná zvýšenou aktivitou glukozylceramid syntázy (GCS), čo vedie ku zvýšenej rezistencii voči cytostatikám. V predchádzajúcej práci bolo popísané, že myšie leukemické bunky L1210 v dôsledku selekcie voči vinkristínu (R bunky) exprimujú Pgp, majú zníženú hladinu UDP-glukózy v porovnaní s citlivými S bunkami. Znížená dostupnosť UDP-glukózy ako donora glukózy v glykozylačných reakciách R buniek môže limitovať glykozyláciu ceramidu katalyzovanú GCS. Zvýšená expresia Pgp v Pgp-pozitívnych L1210 bunkách sa môže spájať so zníženou glykozyláciou ceramidu.

V tejto práci sme preverili správnosť našej hypotézy. Sledovali sme expresiu a aktivitu Pgp a GCS, hladiny UDP-glukózy, plnenie sa buniek C12-NBD-ceramidom (fluorescenčným analógom ceramidu) a bunkovú smrť indukovanú ceramidmi s rôzne dlhými reťazcami v S a R bunkách. Použili sme aj ďalší typ Pgp-pozitívnych L1210 buniek – T bunky, ktoré exprimujú Pgp v dôsledku transfekcie génom kódujúcim ľudský Pgp. Zistili sme, že Pgp-pozitívne R a T bunky majú signifikantne zníženú glykozyláciu C12-NBD-ceramidu a menšie množstvo UDP-glukózy v porovnaní so senzitivnými S bunkami. Všetky tri typy L1210 buniek majú veľmi podobnú dynamiku plnenia sa C12-NBD-ceramidom. Pgp-pozitívne R a T bunky sú citlivejšie na indukciu bunkovej smrti exogénnymi ceramidmi, predovšetkým C2-ceramidom, v porovnaní s S bunkami.

Podakovanie: Prácu podporili grantové agentúry VEGA 1/0471/11, VEGA 1/0441/11 a APVV-14-0334. Práca vznikla s podporou Agentúry pre štrukturálne fondy v rámci projektu Vybudovanie Kompetenčného centra pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej medicíny (ITMS: 26240220071):

Účinok exogénneho zvýšenia maternálneho testosterónu na génovú expresiu prozápalových faktorov v závislosti od genetickej línie mláďat prepelíc japonských

Zuzana Kaňková¹, Monika Okuliarová¹, Michal Zeman^{1,2}

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

² *Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika*

Testosterón ako dominantný androgén má imunomodulačné vlastnosti. Väčšina *in vivo* prác realizovaných u dospelých jedincov popísala negatívny aktivačný účinok zvýšených plazmatických hladín testosterónu na imunitný systém. Preto je testosterón dávaný do súvislosti s medzipohlavnými rozdielmi v aktivite imunitného systému a v súčasnosti sa *in vitro* štúdie sústreďujú na molekulárne mechanizmy účinku pohlavných hormónov na imunitný systém. V našich predošlých experimentoch, ktoré sa venovali organizačným efektom maternálneho testosterónu na imunitný systém mláďat prepelice japonskej, sme pozorovali pozitívne účinky selekcie na vysoký maternálny testosterón na niektoré parametre imunitnej odpovede. V ďalšej fáze výskumu sme potvrdili potenciál samotných pohlavných steroidov ovplyvňovať génovú expresiu imunitných mediátorov v *in vitro* štúdiách. V aktuálnom experimente sme sa zamerali na stanovenie organizačných účinkov maternálneho testosterónu na génovú expresiu prozápalových faktorov, ktoré boli vybrané na základe predošlej *in vitro* štúdie. Využili sme model dvoch línií prepelíc japonských selektovaných na vysoký (HET) a nízky (LET) obsah testosterónu vo vajcovom žĺtku v kombinácii s podaním exogénneho testosterónu (50 ng/vajce) do vajcového žĺtku, čím sme simulovali akútne zvýšenie depozície testosterónu pod vplyvom environmentálnych podmienok. Do vajec kontrolnej skupiny bol rovnakým spôsobom podaný sterilný olej. Po vyliahnutí sme u 27-dňových mláďat v *in vivo* experimente pozorovali vplyv tejto kombinovanej depozície maternálneho testosterónu na génovú expresiu prozápalových faktorov (interleukín-6 a chemokín K203) v slezine počas akútnej fázy imunitnej odpovede 3 hodiny po podaní lipopolysacharidu (LPS). Génová expresia oboch sledovaných parametrov výrazne stúpila po podaní LPS, pričom sme zaznamenali signifikantnú interakciu oboch sledovaných faktorov (línia×exogénny testosterón) v prípade interleukínu-6 a podobná tendencia ($p=0,055$) bola viditeľná aj v prípade chemokínu K203. Genetickou selekciou zvýšený testosterón v kontrolnej skupine stimuloval génovú expresiu oboch prozápalových mediátorov. Podanie exogénneho testosterónu pôsobilo v závislosti od príslušnosti mláďat

ku konkrétne línii. U mláďat LET línie vyvolalo podanie exogénneho testosterónu zvýšenú génovú expresiu oboch mediátorov, čím sa dostali na úroveň kontrolnej skupiny HET línie. U HET línie sme pozorovali naopak numerický pokles sledovaných hodnôt po podaní exogénneho testosterónu. Naše experimenty opakovane potvrdili potenciál maternálneho testosterónu stimulovať nešpecifickú imunitnú odpoveď. Výsledky naznačujú, že aktivačné a organizačné účinky pohlavných steroidných hormónov sa môžu líšiť. Tieto rozdiely môžu odrážať rozdiely v mechanizme aktivačných a organizačných účinkov, ako aj zmenenú schopnosť tkanív odpovedať na daný hormón. Tento predpoklad budeme ďalej analyzovať na úrovni génovej expresie androgénových receptorov v tkanivách imunitných orgánov.

PodĎakovanie: Práca bola podporená grantom VEGA 1/0686/15.

Štruktúrna analýza glykokonjugátov v medicínskej diagnostike

Pakanová Zuzana¹, Mucha Ján¹

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava, Slovensko

Genóm a proteóm boli posledné desaťročia považované za najvyšší nástroj poznania živých organizmov a zároveň aj sledovania ich patologických stavov na úrovni molekulárnej biológie. Dnes veda postúpila od genomiky a proteomiky až na úroveň glykomiky a zistilo sa, že nielen genetický kód a jeho expresia sú esenciálne faktory života. Glykány sú v ľudskom tele široko distribuované – či už vo forme glykokonjugátov alebo voľne a sú zahrnuté do mnohých biologických a fyziologických procesov. Posttranslačné modifikácie proteínov a teda aj glykozylácia hrajú životne dôležitú úlohu. Sacharidové jednotky, špecificky pridávané na proteíny alebo lipidy determinujú ich konečnú biologickú funkciu.

Rozvoj glykomiky ako samostatnej vednej disciplíny umožnil až nástup citlivých analytických techník, ktoré otvárajú dvere k čoraz dôkladnejšiemu štúdiu glykánov a ich funkcií. Práve vďaka týmto prístupom sa postupne zisťuje korelácia medzi niektorými ochoreniami a chybnou štruktúrou sacharidickej časti glykokonjugátov ľudského tela. Abnormality v glykozylačnom profile boli zistené u pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou (1), počas infekcie (2) a vo viacerých klinických biomarkeroch nádorových ochorení bolo potvrdené, že transformácia buniek je v korelačnom vzťahu so zmenami v oligosacharidovej štruktúre (3).

Pre stanovenie štruktúry N-viazaných oligosaccharidov sme optimalizovali a zaviedli komplexnú metodiku. Cieľový glykoproteín, resp. súbor glykoproteínov, je štiepený vhodnou proteázou a glykozylačné miesta sú určené z nameraných hmotnostných spektier pomocou softvérových proteomických nástrojov. Peptidy nesúce na svojich sekvenciách glykány sú zakoncentrované pomocou iónovymennej chromatografie a následne deglykozylované. Uvoľnené glykány sú izolované a frakcionované na neutrálnu a nabitú (obsahujúcu glykány s terminálnou kys. sialovou) frakciu. Každá frakcia je ďalej detailne analyzovaná pomocou automatizovaného LC-MS prístupu, pozostávajúceho z fluorescenčného značenia, umožňujúceho kvantifikáciu jednotlivých štruktúr a zo samotnej HIAX („hydrophilic interaction and anion exchange“) separácie s detekciou na MALDI TOF/TOF hmotnostnom spektrometri. Jednotlivé spektrá sú v prvotnom prístupe interpretované pomocou databáz a priestorové rozloženie (tzv. vetvenie) i väzby medzi jednotlivými monosacharidmi sú potvrdené prostredníctvom exoglykozidázových štiepení, ¹H NMR spektrometriou alebo špecifickou chemickou esterifikáciou.

Pre štruktúrnu analýzu O-viazaných oligosacharidov sme študovali reprezentatívny glykoproteín, apolipoproteín CIII, ktorý nesie jedno O-glykozylačné miesto. Metóda na analýzu O-glykánov bola vypracovaná s dôrazom na efektivitu, presnosť a časovú nenáročnosť analýzy; kde iba 2 µl séra postačujú na detekciu zmien v mechanizme O-glykozylácie pri jednotlivých patologických stavoch.

Zavedenie rýchlych, presných a spoľahlivých metód na diagnostiku porúch súvisiacich s metabolizmom glykokonjugátov priamo (tzv. kongenitálne poruchy glykozylácie a lyzozomálne poruchy) i nepriamo (okologické a iné ochorenia) je limitujúce pre ďalšie štúdium týchto ochorení.

Literatúra:

1. Kizuka Y, et al. (2015). An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 7(2):175-189.
2. Balog CI, et al. (2010). Mass spectrometric identification of aberrantly glycosylated human apolipoprotein C-III peptides in urine from *Schistosoma mansoni*-infected individuals. *Mol Cell Proteomics* 9(4): 667-81.
3. Stowell SR, et al. (2015). Protein glycosylation in cancer. *Ann Rev Pathology* 10:473-510.

PodĎakovanie: Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Glykomiku, ITMS 26240120031, VEGA 2/0188/14, Ernst Mach Grant a FWF P25058.

Identifikácia a charakterizácia väzobných vlastností nukleárných retinoid X receptorov v pečeni potkana

Toporová Lucia, Macejová Dana, Brtko Július

Ústav experimentálnej endokrinológie, Slovenská akadémia vied, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika

Rast, diferenciácia buniek, bunkový cyklus, embryonálny vývin, regulácia signálnych procesov, apoptóza a mnohé ďalšie kľúčové procesy prebiehajúce v živých systémoch sú ovládané prostredníctvom ligandom aktivovateľných transkripčných faktorov, ktorými sú nukleárne receptory. Významní členovia tejto superrodiny, retinoidné X receptory (RXRs), vystupujú ako promiskuitní heterodimerizační partneri pre niektoré nukleárne receptory za účelom vytvorenia permisívnych a nepermisívnych heterodimérov, ako aj heterodimérov označovaných ako „conditional heterodimers“. Heterodimerizačný proces spolu s naviazaním príslušného ligandu na receptor a následným nasadením vytvoreného komplexu na rezpozívny element molekuly DNA sú teda základnými aktivačnými podmienkami na spustenie transkripčnej mašinerie génov kódujúcich už vyššie spomínané procesy nielen v zdravých, ale aj v patogénnych prejavoch biologických systémov. Preto je dôležité charakterizovať prirodzené RXRs ligandy a následne identifikovať a syntetizovať ich funkčné ekvivalenty - rexinoidy s cieľom molekulovo-cielenej terapie niektorých patogénnych stavov v organizme. Prirodzene vyskytujúcim sa ligandom pre RXRs je kyselina 9-cis retinová (9-cRA). Agonistický, resp. antagonistický potenciál rexinoidov je daný jednak precíznou ligand-receptor konformáciou, ako aj mierou ich interakcie s príslušnými koregulátormi.

Všadeprítomné environmentálne polutanty napr. triorganocínové deriváty, najmä tributylcín chlorid (TBT-Cl) a trifenylocín chlorid (TPT-Cl), boli charakterizované ako vysokoafinitné RXRs ligandy. Pôsobenie týchto látok v organizme indukuje imunosupresívne, metabolické, reprodukčné, vývinové, ako aj endokrinne disruptívne zmeny u stavovcov a u niektorých bezstavovcov. Už nanomolárne koncentrácie tributylcínových derivátov (TBTs) spôsobujú aktiváciu a následnú transkripčnú aktivitu RXR heterodiméru, čím spúšťajú procesy ako diferenciácia adipocytov, či dysregulácia génu pre enzým aromatázu. Na druhej strane, nedávne štúdie naznačujú ich potenciálne sľubnú úlohu v onkológii, a to vďaka svojim cytotoxickým účinkom na niektoré tumorózne bunkové kultúry.

V tejto práci sme na metodickom podklade predchádzajúcej práce týkajúcej sa „radioligand binding assay“ all-trans retinoidných receptorov (RARs) [1] overovali maximálnu väzobnú kapacitu (B_{max}) a afinitu (rovnovážna asociačná konštanta, K_a) RXRs pomocou kompetičnej

analýzy vyhodnotenej vo forme Scatchardovej závislosti. Bodovou analýzou sa zisťovalo, či vybrané organocínové zlúčeniny resp. iné vysokoafinitné ligandy RXRs môžu vytesniť rádioaktívne označenú kyselinu 9-cRA z väzobných miest nukleárných receptorov. Vytesnenia-schopné ligandy sme taktiež podrobili kompetičnej analýze. Získané výsledky naznačujú, že TBT-CI a TPT-CI disponujú porovnateľnou väzobnou kapacitou ako prirodzený ligand RXRs (9-cRA), pričom TBT-CI sa javí ako takmer rovnocenný kompetítor voči 9-cRA.

Literatúra:

[1] Brtko, J.: Accurate determination and physicochemical properties of rat liver nuclear retinoic acid (RA) receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204: 439-445, 1994.

Podakovanie: Táto práca vznikla za podpory grantov APVV-0160-11 a VEGA 2/0171/14.

Prítomnosť P-glykoproteínu v bunkách AML je spojená s expresiou nestínu, markera nervových kmeňových a progenitorových buniek

Martina Cocuľová¹, Zuzana Kočibálová¹, Denisa Imrichová², Albert Breier^{1,2}

¹Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia FCHPT STU, Bratislava

²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava

Nestín (neuronal stem cell protein) je cytoskeletárny proteín, ktorý patrí do VI. triedy intermediárnych filamentov (IF). IF proteíny zabezpečujú mechanickú integritu bunky a ovplyvňujú zložité molekulárne mechanizmy v bunke. Nestín bol prvýkrát identifikovaný v bunkách vyvíjajúceho sa centrálného nervového systému (CNS), preto je všeobecne považovaný za marker nervových kmeňových a progenitorových buniek. Nestín exprimujú rôzne typy buniek vyvíjajúceho sa plodu počas cicavčej embryogenézy. V bunkách dospelého organizmu je lokalizácia nestínu striktne vymedzená a slúži ako spiaca bunková rezerva, schopná proliferácie, diferenciácie a migrácie, ktorá je re-aktivovaná ako dôsledok patologických podmienok. Bunky exprimujúce nestín vykazujú charakteristiky, ktoré sú typické pre progenitorové bunky, ako je multipotencia, vysoká proliferácia a schopnosť regenerácie. Re-expressia alebo nadregulácia nestínu môže indikovať intenzívnu remodeláciu alebo reverziu k nediferencovanému fenotypu. Nestín bol doposiaľ detegovaný aj v celej škále solídnych nádorov. Miera jeho expresie v nádoroch koreluje s malignitou a invazivitou, preto sa považuje za negatívny prognostický marker. V našom laboratóriu sme zistili expresiu nestínu v bunkách akútnej myeloidnej leukémie (AML) pod selekčným tlakom troch cytostatických látok: vinkristínu, mitoxantrónu a azacytidínu. V týchto bunkách je nestín koexprimovaný s P-glykoproteínom (P-gp), ATP závislým transmembránovým proteínom, ktorý negatívne ovplyvňuje účinnosť liečby nádorových ochorení elimináciou liečiva von z bunky. Naše výsledky naznačujú, že samotná prítomnosť P-gp vyvoláva v bunke výrazné fenotypové zmeny, ktoré pôsobia na expresiu nestínu.

AML je najrozšírenejší typ akútnej leukémie dospelých s variabilným biologickým správaním a prognózou, preto je v súčasnosti venovaná veľká pozornosť novým prognostickým markerom, ktoré by umožnili determinovať pacientov na základe ich individuálnych faktorov a optimalizovať ich liečbu. Detekcia nestínu by mohla byť nápomocná pri vyhodnotení biologického správania sa nádoru, spresnení prognózy a správnej voľbe liečebnej stratégie.

Podakovanie: Táto práca bola podporená projektmi: Kompetenčné centrum „Vybudovanie Kompetenčného centra pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej medicíny“ ITMS 26240220071, APVV-02-90-10 a VEGA 2/0100/12, 2/0182/13.

Rozdielny vplyv inhibície proteazómu na bunkové línie T98G a SH-SY5Y

Ivana Pilchová¹, Katarína Kliková¹, Andrea Štefaniková¹, Katarína Klačanová¹, Katarína Dibdiaková¹, Simona Saksonová¹, Michal Cagalinec², Lucia Lichvárová², Peter Račay¹

¹ *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 036 01, Martin, Slovenská Republika*

² *Oddelenie farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita v Tartu, Ravila 19, 504 11, Tartu, Estónsko*

Úvod:

V prípade dysfunkcie proteazómu dochádza ku narušeniu degradačného procesu bielkovín v bunke, čím dochádza ku hromadeniu a následnej agregácii polyubikvitinovaných bielkovín v cytoplazme. Prítomnosť nerozpustných polyubikvitinovaných agregátov bielkovín bola okrem neurodegeneratívnych ochorení pozorovaná aj v prípade ischemicko-reperfúzneho poškodenia mozgu. V súčasnosti je stále aktuálny predpoklad, že agregácia bielkovín môže zohrávať významnú úlohu v mechanizme oneskorenej smrti selektívne zraniteľných neurónov. Cieľom našej práce bolo prispieť ku objasneniu mechanizmu, akým inhibícia proteazómu a následná agregácia bielkovín vplyva na reguláciu bunkovej smrti.

Materiál a metódy:

Bunky neuroblastómovej línie SH-SY5Y a glioblastómovej línie T98G boli ovplyvnené proteazómovým inhibítorom bortezomibom (Velcade, PS-341). Relatívne prežívanie buniek bolo hodnotené MTT testom a relatívne hladiny vybraných bielkovín pomocou western blot analýzy. Expresia génov zapojených do regulácie apoptózy bola stanovená pomocou qRT-PCR na TLDA platniach. Vplyv bortezomibu na mitochondriálnu dynamiku a morfológiu sme sledovali na primárnej kultúre hipokampálnych neurónov potkana po transfekcii fotokonvertujúcim mito-KikumeGRI pomocou laserovej konfokálnej mikroskopie.

Výsledky a diskusia:

K poklesu relatívneho prežívania buniek dochádzalo po viac ako 24 h inkubácii u oboch línií, pričom v dlhších inkubačných časoch (48, 72 h) vykazovali bunky SH-SY5Y vyššiu senzitivitu voči inhibícii proteazómu ako línia T98G. Signifikantný nárast hladiny vysokomolekulových polyubikvitinovaných bielkovín bol však pozorovaný už po 4 h inkubácii u oboch línií a aj miera ich tvorby bola v oboch líniách podobná. Napriek obdobnej intenzite proteazómového stresu sme pozorovali výrazne vyššiu intenzitu stresovej odpovede (Hsp70, Hsp90) v bunkách T98G, ktorá nebola asociovaná s aktiváciou kaspáz (9, 3) ani uvoľnením cytochrómu c z mitochondrií. V prípade línie SH-SY5Y sme pozorovali

signifikantné zmeny niektorých apoptózu regulujúcich bielkovín na translačnej (Noxa, Puma, Mcl-1) aj transkripčnej (Puma, Bik, Bcl-2) úrovni, aktiváciu kaspázy 3 aj uvoľnenie cytochrómu c z mitochondrií. Inhibícia proteazómu v hipokampálnych neurónoch potkana zasahovala aj do regulácie mitochondriálnej dynamiky a inhibovala frekvenciu mitochondriálnych fúzií, čím sa posunula rovnováha v prospech mitochondriálneho delenia a dochádzalo ku zníženiu priemernej dĺžky mitochondrií. Zatiaľ čo inhibičný vplyv na mitochondriálne fúzie pretrvával aj po 24 h, obmedzenie počtu mitochondriálnych kontaktov bolo dočasné (2 h) a mitochondriálna mobilita bola po 24 h obnovená.

Záver:

Sledované bunkové línie reagujú na proteazómový stres rozdielne a s rôznou senzitivitou, čo vedie aj k rozdielnym spôsobom indukcie bunkovej smrti. Bunky SH-SY5Y odumierajú mitochondriálnou dráhou apoptózy, zatiaľ čo v prípade T98G predpokladáme, že mechanizmus apoptózy je odklonený a kľúčovú úlohu v tejto regulácii by mohol mať šaperón Hsp70.

Podakovanie: Práca bola podporená grantom APVV č. 0245-11.

Novel substrates for Lon-mediated proteolysis in mitochondria

Kunová Nina¹, Pevala Vladimír¹, Bellová Jana¹, Ondrovičová Gabriela¹, Kutejová Eva^{1,2}

¹ Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 84551 Bratislava, Slovensko

² Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4-Krč, Česká republika

Existence of mitochondria is one of the characteristic features of eukaryotic cells. Apart from their most prominent role in synthesis the majority of cellular ATP, mitochondria are also involved in other metabolic functions, many of which influence vitality of whole organism. Mitochondria possess their own genetic system, which encodes number of essential protein subunits, tRNAs and rRNAs. From that point of view, they represent unique, semi-autonomous organelles, which associate several different groups of proteins. One such group, involved in packaging and organizing of mitochondrial DNA into nucleoids, is represented by Abf2p in *Saccharomyces cerevisiae* and TFAM in human mitochondria. Other group contains Mgm101, which ensures maintenance and dynamics of mtDNA within yeast cells. Besides, there is also ATP-dependent protease Lon, which removes and degrades damaged, non-assembled, misfolded or otherwise unnecessary proteins within mitochondrial matrix, and thus prevents their aggregation and further distortion of the cellular homeostasis. To shed more light on possible role of Lon-mediated proteolysis in mitochondria, we have cloned, expressed and purified yeast nucleoid proteins, Abf2p and Mgm101, and designed several in vitro cleavage experiments with Lon protease and various endogenous agents. Our results in connection with previous study on human mitochondrial packaging protein TFAM represent an interesting insight into studying of metabolism and dynamics of mitochondrial DNA in yeast as well as humans.

Acknowledgement: This research was funded by the grants from the Slovak Research and Development Agency (APVV-0123-10) and Slovak Grant Agency (VEGA 2/0113/14).

Expresia proteínov Mfn2, DRP1 a VDAC1 pri ischemicko-reperfúznom poškodení mozgu

Klačanová Katarína¹, Pilchová Ivana¹, Dibdiaková Katarína¹, Chomová Mária², Račay Peter¹

¹ Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin, Malá Hora 4D, 03601 Martin, Slovensko

² Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK Bratislava, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovensko

Úvod:

Mitochondrie zohrávajú v bunke dôležitú úlohu ako producenti energie. Za fyziologických podmienok podstupujú procesy štiepenia a fúzie, nevyhnutné pre udržanie optimálnych morfológických vlastností potrebných pre produkciu ATP. Udržanie rovnováhy medzi štiepením a fúziou je dôležité najmä v neurónoch, z dôvodu vysokej energetickej náročnosti neurónov a dlhých mitochondriálnych transportných vzdialeností, najmä v motorických neurónoch [1]. Jedny z hlavných proteínov zúčastňujúcich sa týchto procesov sú i mitofuzín-Mfn2 (fúzia) a DRP1 (štiepenie). Tieto proteíny spolu s VDAC1 ovplyvňujú a obmieňajú úzky kontakt medzi mitochondriami a ER, pričom zohrávajú významnú úlohu i v procese bunkovej smrti. Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv globálnej ischemie mozgu na expresiu proteínov Mfn2, DRP1 a VDAC1.

Materiál a metódy:

V experimentoch boli použité samce potkanov kmeňa Wistar (Dobrá voda, SR). Potkany boli vystavené 15 min globálnej mozgovej ischemii použitím modelu štvorcievnej oklúzie, po ktorej nasledovala reperfúzia v trvaní 1, 3, 24 a 72 hodín. Mitochondrie boli izolované z hipokampov a kortexov potkanov diferenciálnou centrifugáciou. Proteíny získané z mitochondrií boli separované pomocou SDS-PAGE elektroforézy a hladiny sledovaných proteínov sme následne stanovili pomocou Western blotovej analýzy. Pre lepšiu charakterizáciu VDAC1 sme proteíny z kortex homogenátov separovali pomocou izoelektrickej fokusácie, 2D elektroforézy a analyzovali hmotnostným spektrometrom.

Výsledky a diskusia:

Zistili sme, že globálna ischemia mozgu neovplyvnila celkovú hladinu DRP1, avšak viedla k akumulácii tohto proteínu v mitochondriách izolovaných z kortexov potkanov podrobených ischemii s nasledovnou reperfúziou v trvaní 1, 3, 24 a 72 hodín. V celkových hladinách proteínu Mfn2 sme pozorovali zníženie jeho hladiny po ischemii ako aj zvýšenie po ischemii nasledovanou reperfúziou v trvaní 1, 3 a 24 hodín. Štatisticky významne znížené hladiny

proteínu Mfn2 sme zaznamenali v mitochondriách izolovaných z kortexu potkanov, a to po ischémii a 1, 3, 24, 72 hodinovej reperfúzií. Pri analýze homogenátov z hipokampu kontrolných a experimentálnych zvierat sme zistili, že dochádza k významnému nárastu hladiny VDAC1 po ischémii s 3 hodinovou reperfúziou. Vzhľadom k tomu, že aktivita proteínu VDAC je regulovaná fosforyláciou, skúmali sme pomocou proteomickej analýzy i post-translačné modifikácie tohto proteínu. Zistili sme, že oproti kontrole je VDAC1 fosforylovaný v kortex homogenátoch, po ischémii s nasledovanou 24 hodinovou reperfúziou.

Záver:

Naše experimenty poukázali na možné zapojenie proteínov Mfn2, DRP1, VDAC1 v procese ischémii vyvolanej bunkovej smrti. Mechanizmus ich aktivácie, resp. inhibície po ischémii mozgu ako aj účasť proteínov v procese oneskorenej bunkovej smrti však nie je úplne jasná.

Literatúra:

[1] Wappler, E.A., Institoris, A., Dutta, S., Katakam, P.V.G., Busija, D.W. Mitochondrial Dynamics Associated with Oxygen-Glucose Deprivation in Rat Primary Neuronal Cultures. PLoS ONE, 2013, 8, e63206.

Podakovanie: Práca bola podporená APVV grantom č. 0245-11.

Nosia lastovičky len jar?

Ľudmila Hrehová¹, Peter Pristaš²

¹ Ústav biologických a ekologických vied UPJŠ, Mánesova 23, 04001, Košice, Slovensko

² Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 04001, Košice, Slovensko

Enterokoky patriace do okruhu *E. faecalis* sú jednými z najčastejšie sa vyskytujúcich enterokokov v tráviacom trakte teplokrvných živočíchov. Práve *E. faecalis* je však súčasne jedným z pôvodcov väčšiny humánnych infekcií vyvolaných enterokokmi a najčastejším nozokomiálnym patogénom. Pri analýze enterokokov izolovaných z faeces voľne žijúcich vtákov sa nám podarilo získať viaceré izoláty patriace do tohto okruhu. Izolát LA7, ktorý je na úrovni 16S rRNA sekvencie podobný druhu *E. rotai*, však vykazuje viaceré odlišnosti v biochemickom profile a je odlišný od doteraz identifikovaných druhov. Blastn analýza voči non-redundantnej GenBank databáze naznačuje, že 16S rRNA sekvencie izolátu LA7 sú unikátne a nateraz neboli získané zo žiadneho iného prostredia. Na základe doterajších výsledkov sa môžeme domnievať, že sa jedná o nový druh rodu *Enterococcus*, ktorý si vyžaduje ďalší výskum.

PodĎakovanie: Práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0087/14.

***In silico* analýza 4-alfa-glukanotransferáz z rodiny GH77**

Kuchtová Andrea¹, Janeček Štefan^{1,2}

¹ *Laboratórium evolúcie proteínov, Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava*

² *Katedra biológie, Fakulta prírodných vied UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava*

V systéme klasifikácie enzýmov aktívnych voči sacharidom CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) je rodina GH77 monošpecifickou rodinou glykozidových hydroláz (GH) obsahujúcou 4- α -glukanotransferázy (EC 2.4.1.25), ktoré sú u prokaryotov známe ako amylomaltázy [1] a u rastlín (vrátane rias) ako disproporcionačné enzýmy [2]. Spolu s rodinami GH13 a GH70 tvorí α -amylázový klan GH-H [3]. V súčasnosti je v rodine GH77 viac ako 2700 členov s jednoznačnou dominanciou bakteriálnych proteínov [4]. Táto štúdia [5] prináša bioinformatickú analýzu 416 vybraných sekvencií z rodiny GH77 so zameraním na: (i) amylomaltázy z borélií, ktoré obsahujú unikátne substitúcie v pozíciách funkčne dôležitých aminokyselinových zvyškov [6]; a (ii) disproporcionačné enzýmy 2 (DPE2) z rastlín, ktoré majú medzi katalytickým nukleofilom a donorom protónu sekvenčný inzert ~140 aminokyselín [7]. Detailnou *in silico* analýzou bolo zistené, že: (i) v rode *Borrelia* môže existovať postupný evolučný prechod od typických bakteriálnych amylomaltáz (reprezentovaných enzýmom z *Thermus aquaticus* [8]) ku verzii amylomaltáz, ktoré obsahujú mutácie vo veľmi dôležitých a inak invariantne konzervovaných aminokyselinových pozíciách; a (ii) vzhľadom k rastlinným DPE2 bola identifikovaná veľká skupina bakteriálnych amylomaltáz (reprezentovaná enzýmom z *Escherichia coli* [9]) s dlhším N-koncom ako pravdepodobný intermediát medzi „Thermus-like” a „DPE2-like“ (pozorovanými tiež u baktérií). Dosiahnuté výsledky môžu byť využité v proteínovom inžinierstve a dizajne týchto amylolytických enzýmov.

Literatúra:

- [1] Terada Y, Fujii K, Takaha T & Okada S 1999 Appl Environ Microbiol 65: 910-915.
- [2] Takaha T, Yanase M, Okada S & Smith SM 1993 J Biol Chem 268: 1391-1396.
- [3] MacGregor EA, Janecek S & Svensson B 2001 Biochim Biophys Acta 1546: 1-20.
- [4] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM & Henrissat B 2014. Nucleic Acids Res 42: D490-D495.
- [5] Kuchtova A & Janecek S 2015 Biochim Biophys Acta 1854: 1260-1268.
- [6] Godany A, Vidova B & Janecek S 2008 FEMS Microbiol Lett 284: 84-91.
- [7] Steichen JM, Petty RV & Sharkey TD 2008 J Biol Chem 283: 20797-20804.
- [8] Przylas I, Tomoo K, Terada Y, Takaha T, Fujii K, Saenger W & Sträter N 2000 J Mol Biol 296: 873-886.
- [9] Weiss SC, Skerra A & Schiefner A 2015 J Biol Chem (in press); doi: 10.1074/jbc.M115.667337.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA č. 2/0150/14.

***In silico* analýza glukán vetviacich enzýmov z alfa-amylázovej rodiny GH57**

Mária Martinovičová¹, Štefan Janeček^{1,2}

¹ *Katedra biológie, Fakulta prírodných vied UCM, 91701 Trnava, Slovensko*

² *Laboratórium evolúcie proteínov, Ústav molekulárnej biológie SAV, 84551 Bratislava, Slovensko*

Rodina glykozidových hydroláz GH57 je známa ako druhá α -amylázová rodina [1]. V rámci CAZy databázy bola etablovaná v roku 1996 [2]. V súčasnosti sú v rodine GH57 potvrdené enzýmové špecificity α -amyláz, amylopullulanáz, 4- α -glukanotransferáz, ďalej glukán-vetviace enzýmy, maltogénne amylázy, α -galaktozidázy, nešpecifikované amylázy a duálna amylopullulanáza-cyklomaltodextrináza [3-5]. Zaujímaví sú členovia s neúplnou katalytickou mašínériou (pravdepodobne bez enzymatickej funkcie), tzv. „ α -amylase-like“ proteíny [3]. Všetky amylolytické enzýmy rodiny GH57 využívajú retenujúci reakčný mechanizmus a ich katalytická doména je tvorená (β/α)7-barelom (tzv. nekompletný TIM-barel), za ktorým nasledujú zvyčajne štyri α -helixy [6,7]. Celá rodina je charakterizovaná 5 konzervovanými sekvenčnými regiónmi (KSR) [8] - známe aj ako „sekvenčné odtlačky prstov“ vo forme sekvenčného loga [4], z ktorých 4 sú lokalizované v rámci katalytického (β/α)7-barelu a piaty je umiestnený v α -helikálnej oblasti za barelom [3-5]. Katalytickú mašínériu tvoria kyselina glutámová (katalytický nukleofil) - Glu123 (počítané podľa 4- α -glukanotransferázy z *Thermococcus litoralis*) na vlákne β 4 (KSR3) a kyselina asparágová (donor protónu) - Asp214 na vlákne β 7 (KSR4) [6,7]. Predkladaná práca je venovaná bioinformatickej analýze glukán vetviacich enzýmov z rodiny GH57. Pomocou sekvenčného loga bolo z databázy CAZy zozbieraných viac ako 350 sekvencií potenciálnych glukán vetviacich enzýmov, pričom ďalších 14 veľmi príbuzných sekvencií obsahovalo nekompletnú katalytickú mašínériu; tieto sú navrhnuté ako skupina tzv. glukán vetviacich enzýmov-like. Detailná sekvenčná analýza všetkých študovaných glukán vetviacich enzýmov spolu so skupinou „glukán vetviacich enzýmov-like“ môže priniesť vylepšenie, resp. jemnejšie rozlíšenie etablovaného sekvenčného loga pre túto enzýmovú špecificitu s ohľadom na prípadné drobné rozdiely v ich sekvenciách, ako aj taxonómiu.

Literatúra:

- [1] Janecek S 2005 *Biologia* 60 (Suppl. 16): 177-184.
- [2] Henrissat B & Bairoch A 1996 *Biochem. J.* 316: 695-696.
- [3] Janecek S & Blesak K 2011 *Protein J.* 30: 429-435.
- [4] Blesak K & Janecek S 2012 *Extremophiles* 16: 497-506.
- [5] Blesak K & Janecek S 2013 *Microbiology* 159: 2584-2593.
- [6] Imamura H, Fushinobu S, Yamamoto M, Kumasaka T, Jeon BS, Wakagi T & Matsuzawa H 2003 *J. Biol. Chem.* 278: 19378-19386.

[7] Palomo M, Pijning T, Booiman T, Dobruchowska JM, van der Vlist J, Kralj S, Planas A, Loos K, Kamerling JP, Dijkstra BW, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L & Leemhuis H 2011 J. Biol. Chem. 286: 3520-3530.

[8] Zona R, Chang-Pi-Hin F, O'Donohue MJ & Janecek S 2004 Eur. J. Biochem. 271: 2863-2872.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantom UCM v Trnave č. FPPV-24-2015 a VEGA grantom č. 2/0150/14.

Vplyv konidiácie na tvorbu proteolytických enzýmov u *Trichoderma* spp.

Maťaťa Matej¹, Steyaert Johanna Maria², Šimkovič Martin¹

¹ Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

² Bio-Protection Research Centre, Lincoln University, New Zealand

Slnčné žiarenie, primárny zdroj denného svetla na Zemi, je nevyhnutnou súčasťou života a predstavuje prirodzený podnet, ktorý ovplyvňuje metabolizmus mnohých organizmov. Zelené rastliny a riasy a niektoré druhy fototrofných prokaryotických organizmov ho využívajú ako zdroj energie na tvorbu ATP a redukciu NADP⁺ v priebehu svetelnej fázy fotosyntézy. Archaea z rodu *Halobacterium* dokáže vďaka bakteriorodopsínu využívať svetlo na transport protónov a generovať protónmotívnu silu. Pôsobením svetla dochádza k premene dehydrocholesterolu na cholekalciferol, vitamín D₃, v kožných bunkách cicavcov. Absorpcia svetelných lúčov v čapíkoch a tyčinkách vyvoláva fotochemickú reakciu, ktorá je u živočíchov podstatou videnia. U niektorých vláknitých húb svetlo spúšťa (a)sexuálnu reprodukciu a súčasne sa podieľa na regulácii cirkadiálneho rytmu.

U vláknitých húb z rodu *Trichoderma* svetlo z modrej oblasti spektra spúšťa asexuálnu tvorbu konidií. Dôležitú úlohu pri recepcii svetla u *Trichoderma* zohrávajú fotoreceptory BLR-1 a BLR-2, ktoré regulujú úroveň expresie mnohých funkčných génov, ako napríklad gén kódujúci dekarboxylázu kyseliny glutámovej.

Naše pozorovania ukázali, že po exponovaní mycélia *T. atroviride* na svetlo sa v porovnaní s tmavou kontrolou niekoľkonásobne zvýšila syntéza proteáz. Stimulačný účinok svetla bol závislý od pH_{ext}, najvýraznejší vplyv sa zaznamenal pri raste huby v mierne kyslom prostredí. Tento jav nie je univerzálny pre všetkých zástupcov z rodu *Trichoderma*, ale je charakteristický pre *T. atroviride*. Zaujímavosťou je, že konidiogenéza vyvolaná mechanickým stresom alebo prídavkom fyziologicky účinných látok ovplyvňujúcich konidiáciu bola bez výraznejšieho účinku na tvorbu proteolytických enzýmov. Tieto pozorovania naznačujú prítomnosť viacerých signálnych molekúl, ktoré sa podieľajú na spracovávaní externých signálov a súčasne, že svetelný podnet zohráva u huby *T. atroviride* významnú úlohu v regulácii syntézy proteolytických enzýmov.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantovou agentúrou APVV (APVV-0719-12) a grantom Novozélandskej kráľovskej spoločnosti (Marsden fund, 11-LIU-001).

Transglykozylázy bunkových stien kvasiniek

Kováčová Kristína, Farkaš Vladimír

Chemický ústav, SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Bunková stena kvasiniek predstavuje esenciálnu štruktúru, ktorá definuje tvar, udržuje osmotickú stabilitu bunky, participuje vo flokulácii, sporulácii, sprostredkováva medzibunkové interakcie a hrá významnú úlohu pri interakcii hostiteľ – patogén a vo virulencii. Individuálne štrukturálne komponenty polysacharidových polymérov bunkových stien kvasiniek, β -(1,3)-glukán, β -(1,6)-glukán a chitín, sú vzájomne pospájané kovalentnými väzbami do veľkých makromolekulových komplexov založených na β -(1,3)-glukánovej kostre za účasti transglykozylačných enzýmov. Naša pozornosť je zameraná na tzv. „carbohydrate active enzymes“ Crh1p a Crh2p (rodina GH16) zo *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré patria k enzýmom remodelujúcim bunkovú stenu kvasiniek a sú dôležité pre väzbu chitínu k β -(1,3)-glukánu a β -(1,6)-glukánu in vivo (1, 2); a na pH-regulované enzýmy Phr1p a Phr2p z *Candida albicans*, ktoré patria k β -(1,3)-glukanozyltransferázam (rodina GH72) a katalyzujú pripojenie časti molekuly β -(1,3)-glukánu k ďalšej molekule β -(1,3)-glukánu (3).

Cieľom našej práce je stanovenie substrátovej špecificity týchto enzýmov, ktoré boli heterológne exprimované v *Picchii pastoris*, identifikácia produktov transglykozylačných reakcií a návrh metódy na rýchly skrining inhibítorov týchto enzýmov ako jedinečných terčov pre výskum nových antifungálnych látok.

Transglykozylačná aktivita Crh1p, Crh2p, Phr1p a Phr2p bola stanovená fluorescenčnou in vitro metódou (2, 3), ktorá je založená na použití oligosacharidov fluorescenčne značených sulforodamínom (OS-SR) ako akceptorov a na viazaní vysokomolekulových produktov transglykozylačných reakcií do papierovej matrice. Karboxymetyl-chitín (pre Crh1p-2p) a laminarín (pre Phr1p-2p) boli použité ako donory a široké spektrum OS-SR ako artifičné akceptory. Výsledky boli potvrdené vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou. Produkty transglykozylačných reakcií katalyzovaných Crh1p, Crh2p, Phr1p a Phr2p boli separované pomocou TLC a analyzované a identifikované MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou (2, 3) ako hybridné molekuly zložené z OS-SR ako akceptora a časti molekuly donora pripojeného k neredukujúcemu koncu molekuly akceptora.

Metóda na stanovenie inhibítorov týchto enzýmov je založená na ukotvení donorov pre jednotlivé transglykozylačné reakcie do agarového gélu v jamkách ELISA platničky. Vysokomolekulové produkty transglykozylačných reakcií ostávajú uchytené v géli, zatiaľ čo nezreagované akceptory (OS-SR) sú vymyté. Metóda sa ukázala byť vhodná a univerzálna

nielen na stanovenie inhibítorov ale aj na meranie samotnej transglykozylačnej aktivity kvasinkových i rastlinných transglykozyláz.

Literatúra:

1. Cabib E., Farkaš V., Kosik O., Blanco N., Arroyo J., a McPhie P. (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 283: 29859-29872
2. Mazán, M., Blanco, N., Kováčová, K., Firáková, Z., Řehulka, P., Farkaš, V., a Arroyo J. (2013). A novel fluorescent assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *The Biochemical Journal.* 455 (3): 307-318
3. Kováčová, K., Degani, G., Stratilová, E., Farkaš, V. a Popolo, L (2015). Catalytic properties of Phr family members of cell wall glucan remodeling enzymes: implications for the adaptation of *Candida albicans* to ambient pH. *FEMS Yeast Research.* DOI: 10.1093/femsyr/fou011

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 2/0020/12 a ERDF ITMS 26240120031.

Grafén ako inovatívny materiál využívaný pri príprave ultrasenzitívnych lektínových biosenzorov.

Kluková Ľudmila, Filip Jaroslav, Tkáč Ján

Chemický ústav - Centrum glykomiky, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Je všeobecne známe, že rôzne patologické stavy vedú k zvýšeniu koncentrácie špecifických látok (biomarkerov) v krvi alebo moči. Mnohé z týchto biomarkerov nesú na svojom povrchu charakteristické sacharidické štruktúry (glykány), ktoré sú odlišné v porovnaní so zdravými jedincami. Monitorovaním týchto zmien je teda možno odlíšiť chorých od zdravých jedincov a v niektorých prípadoch dokonca určiť aj štádium danej choroby [1-3]. Analýza glykánov v reálnych vzorkách je však často náročná a vyžaduje zložité prístrojové vybavenie. Okrem toho, mnohé súčasne využívané analytické postupy zahŕňajú značenie alebo fragmentáciu cieľových molekúl, čo môže v konečnom dôsledku negatívne ovplyvniť celú analýzu [3]. Naproti tomu, elektrochemické metódy poskytujú veľmi jednoduchú, rýchlu a citlivú analýzu intaktných glykoproteínov v reálnych vzorkách s možnosťou práce v tzv. label-free móde, čím sa stávajú silným nástrojom pri konštrukcii a optimalizácii biosenzorov [4]. Lektíny tvoria veľkú skupinu proteínov s vysokou afinitou k sacharidickým štruktúram, schopných rozpoznávať voľné mono- a oligosacharidy či dokonca celé bunky [5]. Vďaka tomu sú lektínové biosenzory vhodným kandidátom na profilovanie glykánových štruktúr a navyše je ich možno využiť v prípade, keď je cieľová molekula neznáma (vyhľadávanie nových biomarkerov). V súčasnosti je termín biosenzor neoddeliteľne spojený s termínom nanotechnológia. V tejto oblasti je pomerne novým materiálom grafén (jednoatómová planárna (2D) vrstva tvorená atómami uhlíka v hybridnom stave sp² usporiadanými do pravidelných šesťuholníkov). Jeho objav v roku 2004 upútal celosvetovú pozornosť a dnes sa široko využíva v mnohých vedných odboroch vrátane elektrochémie najmä vďaka jeho pôsobivým vlastnostiam [7, 8]. V našej práci demonštrujeme, že grafénový materiál je perspektívnym nástrojom na prípravu lektínových biosenzorov s možnosťou rôznorodej imobilizácie lektínu na povrch biosenzora. Navyše, pripravený biosenzor je schopný detekcie analytu na femtomolárnej úrovni. Niet teda pochyb o tom, že elektrochemické biosenzory, ktoré kombinujú špecifické kvality lektínov a unikátne vlastnosti grafénových materiálov predstavujú inovatívny prístup ku glykoprofilovaniu, avšak tento koncept je stále zriedkavý.

Literatúra:

[1] T. Bertok, L. Klukova, A. Sediva, P. Kasák, V. Semak, M. Micusik, M. Omastova, L. Chovanová, M. Vlček, R. Imrich, A. Vikartovska, and J. Tkac, "Ultrasensitive Impedimetric Lectin Biosensors with

- Efficient Antifouling Properties Applied in Glycoprofiling of Human Serum Samples," *Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 7324-7332, 2013.
- [2] L. Klukova, T. Bertok, M. Petrikova, A. Sediva, D. Mislovicova, J. Katrlík, A. Vikartovska, J. Filip, P. Kasak, A. Andicsova-Eckstein, J. Mosnacek, J. Lukac, J. Rovensky, R. Imrich, and J. Tkac, "Glycoprofiling as a novel tool in serological assays of systemic sclerosis: a comparative study with three bioanalytical methods," *Anal Chim Acta*, vol. 853, pp. 555-62, 2015.
- [3] S. Belicky and J. Tkac, "Can glycoprofiling be helpful in detecting prostate cancer?," *Chemical Papers*, vol. 69, pp. 90-111, 2015.
- [4] T. Bertók, J. Katrlík, P. Gemeiner, and J. Tkac, "Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics," *Microchimica Acta*, vol. 180, pp. 1-13, 2013.
- [5] L. Klukova, T. Bertok, P. Kasak, and J. Tkac, "Nanoscale-controlled architecture for the development of ultrasensitive lectin biosensors applicable in glycomics," *Analytical Methods*, vol. 6, pp. 4922-4931, 2014.
- [6] J. Tkac, T. Bertok, J. Nahalka, and P. Gemeiner, "Perspectives in Glycomics and Lectin Engineering," in *Lectins*. vol. 1200, J. Hirabayashi, Eds.: Springer New York, 2014, pp. 421-445
- [7] J. Filip, P. Kasák, and J. Tkac, "Graphene as signal amplifier for preparation of ultrasensitive electrochemical biosensors," *Chemical Papers*, vol. 69, pp. 112-133, 2015.
- [8] E. Paleček, J. Tkáč, M. Bartošík, T. Bertók, V. Ostatná, and J. Paleček, "Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics," *Chemical Reviews*, vol. 115, pp. 2045-2108, 2015.

Podakovanie: Táto publikácia bola vytvorená v rámci projektov VEGA 2/0127/10, ERC 311532 a bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0282-11.

Včasná diagnostika rakoviny prostaty pomocou analýzy glykánov

Štefan Belický, Ján Tkáč

Chemický ústav - Centrum glykomiky, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

Rakovina prostaty patrí medzi najčastejšie diagnostikované typy rakoviny u mužov v Európskej únii a je prvá v incidencii a tretia v mortalite spomedzi všetkých nádorových ochorení [1]. Tak ako pri všetkých druhoch rakoviny, pozitívny výsledok liečby závisí na včasnej diagnóze a začatí liečby. V súčasnosti sa na detekciu rakoviny prostaty využíva test hladiny prostatického špecifického antigénu (PSA) v krvnom sére, avšak zvýšená hladina PSA môže byť spôsobená aj inými ochoreniami ako rakovina prostaty (napr. benígne zväčšenie prostaty, prostatitída) [2]. Za normálne hodnoty koncentrácie PSA sa považujú hodnoty do 4 ng/ml krvného séra, ale hodnoty od 4 do 10 ng/ml sa považujú za tzv. diagnostickú šedú zónu a vyžadujú ďalšie vyšetrenia, preto je nutné hľadať nové metódy pre diagnostiku rakoviny prostaty. Nakoľko glykozylačné zmeny sú charakteristickým znakom nádorového bujnenia [3] a PSA je glykoproteín, sledovanie zmien v jeho glykozylácii môže znamenať pokrok v diagnostike karcinómu prostaty a viesť k zvýšeniu úspešnosti liečby a tým poklesu mortality.

Literatúra:

1. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. (2013). *European Journal of Cancer* 49, 1374-1403
2. Thakur, V., Talwar, M. & Singh, P. P. (2014). *Indian journal of cancer* 51, 335-337
3. Ruhaak, L. R., Taylor, S. L., Stroble, C., Nguyen, U. T., Parker, E. A., Song, T., Lebrilla, C. B., Rom, W. N., Pass, H., Kim, K., Kelly, K. & Miyamoto, S. (2015). *Journal of proteome research*

Podakovanie: Táto práca bola financovaná FP7 programom Európskej únie pre výskum, technický rozvoj a demonštračné činnosti prostredníctvom Marie Curie ITN PROSENSE, č. grantu 317420, 2012 - 2016

Optimalizácia produkcie rekombinantnej acetylerázy CE16 z *Hypocrea jecorina* a jej bioinformatická analýza

Jamrichová Daniela¹, Godány Andrej¹, Urbániková Ľubica²

¹ *Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovensko*

² *Ústav molekulárnej biológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovensko*

Acetyleráza CE16 z huby *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) je súčasťou komplexu celulolytických enzýmov sekretovaných touto hubou do prostredia a rozkladajúcich bunkovú stenu rastlín. Úloha acetylerázy pri degradácii rastlinnej biomasy nie je zatiaľ úplne známa, avšak v laboratórnych podmienkach sa zistilo, že účinne deacetyluje terminálne acetylované xylooligosacharidy [1] preferenčne v polohe 3 a 4 [2]. Acetyleráza deacetyláciou xylooligosacharidov umožňuje prístup ďalších enzýmov k hlavnému reťazcu substrátu a jeho následnú kompletnú degradáciu. Na základe aminokyselínovej sekvencie acetylerázy bola v roku 2008 etablovaná nová rodina sacharidových esteráz, rodina CE16 [3]. Do rodiny CE16 bolo doteraz zaradených 174 členov (k 25. 08. 2015), pričom ich počet stále narastá. Doteraz však nie je známa terciárna štruktúra žiadneho člena tejto rodiny a charakterizovaní boli len dvaja členovia a to nami študovaná acetyleráza z *T. reesei* a acetyleráza produkovaná hubou *Myceliophthora thermophila* [4]. V genóme *T. reesei* bol identifikovaný gén acetylerázy a neskôr bol naklonovaný do priemyselne využívaného kmeňa *T. reesei* Rut C30. Rekombinantný enzým bol charakterizovaný a bolo dokázané, že je N-glykozylovaný [3]. Glykozylácia prispieva k stabilizácii proteínu, avšak je zdrojom novej heterogenity a komplikácií pri príprave kryštálov potrebných pre určenie terciárnej štruktúry. Pre potreby kryštalizácie ako i z dôvodu uľahčenia prípravy mutantov potrebných pre ďalšie štúdium vzťahu štruktúry a funkcie, sme sa rozhodli pripraviť enzým v jeho neglykozylovanej forme. S týmto cieľom bol navrhnutý a pripravený syntetický gén *tae1* kódujúci acetylerázu CE16, ktorého nukleotidová sekvencia bola optimalizovaná pre expresiu v *E. coli*.

Prvé pokusy o prípravu neglykolyzovanej acetylerázy expresiou syntetického génu v bunkách *E. coli* boli neúspešné, pretože proteín sa síce produkoval, ale v agregovanej, nerozpustnej forme a nezachytával sa na Ni²⁺- agarózovej kolóne. Jednotlivé kroky prípravy rekombinantného proteínu od výberu vhodného produkčného kmeňa *E. coli*, úpravu podmienok kultivácie a indukcie expresie génu, lýzu buniek až po podmienky afinitnej chromatografie bolo potrebné optimalizovať a po optimalizácii všetkých krokov bola

pripravená neglykozylovaná rekombinantná CE16 acetyleráza v rozpustnej a aktívnej forme. Výsledky boli potvrdené SDS-PAGE analýzou, analytickou FPLC, štúdiom na DLS a meraním aktivity. Použité postupy budú predmetom diskusie.

Súčasne s pokusmi zameranými na prípravu proteínu sme sa zamerali aj na bioinformatickú analýzu acetylerázy CE16 a rodiny CE16. Na základe podobnosti primárnej štruktúry bol zostavený evolučný strom rodiny CE16. Ako už zistili Li a kol. [3], členovia rodiny CE16 patria do skupiny serínových hydroláz, presnejšie do superrodiny SGNH hydroláz, rodiny GDSL-like lipáz/acylhydroláz [5]. U väčšiny členov bol identifikovaný vysoko konzervovaný GDSL / GDSY motív, typický pre GDSL lipázy. Zrovnáním aminokyselinových sekvencií boli u väčšiny členov identifikované aminokyselinové zvyšky s pravdepodobnou katalytickou funkciou a funkciou donorov protónov (u acetylerázy triáda Ser36, Asp315, His318 a donory protónov Gly92 a Asn148). Pomocou zrovnania boli identifikované i ďalšie konzervované aminokyselinové zvyšky, predovšetkým tryptofány a fenylalaníny, ktoré môžu zohrávať dôležitú úlohu pri väzbe enzýmu na substrát. Predpokladané aminokyseliny dôležité pre viazanie a štiepenie substrátu plánujeme experimentálne overiť.

Literatúra:

- [1] KREMnický, L.-BIELY, P. Unique mode of acetylation of oligosaccharides in aqueous two-phase system by *Trichoderma reesei* acetyl esterase. *J.Mol.Catal.B-Enzym*, 37, (2005), 72-78.
- [2] BIELY, P. a kol. *Trichoderma reesei* CE16 acetyl esterase and its role in enzymatic degradation of acetylated hemicellulose. *BBA*, 1840, (2014), 516-525.
- [3] LI, X. a kol. Novel family of carbohydrate esterases, based on identification of the *Hypocrea jecorina* acetyl esterase gene. *AEM*, 74, (2008), 7482-7489.
- [4] KOUTANIEMI, S. a kol. 2013. Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. *J. Mol. Biot.*, 168, (2013), 684-692.
- [5] UPTON, C. -BUCKLEY, J. T. A new family of lipolytic enzymes? *Trends in Biochem. Sci.*, 20, (1995), 178-179.

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom UCM FPPV-27-2015, grantmi VEGA No. 2/0190/14 a APVV-0602-12.

Ultrasenzitívna detekcia glykán-proteínových interakcií pomocou glykánového biosenzora

András Hushegyi, Ján Tkáč

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko

Glykány sú oligosacharidy, ktoré majú dôležitú úlohu v mnohých biologických a biochemických procesoch v živých organizmoch. Informatívny charakter glykánov je veľmi dôležitý v bunkovej signalizácii, imunitnej odpovedi, infekciách, metastázach atď. Štúdium glykán-proteínových interakcií nám môže pomôcť pochopiť viaceré patologické a fyziologické procesy. 1

Príprava glykánových biosenzorov zahŕňa nasledujúce kroky: čistenie povrchu, tvorba samo usporiadajúcej sa vrstvy (SAM) a imobilizáciu glykánov. Zlato patrí k najčastejšie využívaným povrchom pre výrobu biosenzorov. Atómy síry sú schopné vytvárať silnú väzbu so zlatom. Táto vlastnosť je využívaná pre jednoduchú modifikáciu zlatého povrchu tiolmi, s rôznymi funkčnými skupinami, s rôznou dĺžkou a štruktúrou.² Existuje viacero techník pre imobilizáciu glykánov na povrch biosenzora. Najčastejšie využívaná metóda je amínová väzba, pri ktorom sa karboxylové funkčné skupiny na tioloch aktivujú roztokom karbodiimidu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS), čo vedie k tvorbe amino reaktívneho esteru. Amino reaktívny ester je následne schopný viazať derivatizovaný glykán s amino skupinou.³ Glykánové biosenzory nám ponúkajú možnosť detekcie glykán-proteínových interakcií s detekčnými metódami bez značenia (label-free detekčné metódy). Najčastejšie využívané label-free detekčné metódy sú elektrochemická impedančná spektroskopia (EIS), mikroskopia atomárnych síl (AFM) alebo povrchová plazmónová rezonancia (SPR). Glykánové biosenzory našli uplatnenie v oblastiach nanobiotechnológie a glykobiotechnológie, pri štúdiu glykán proteínových interakcií (lektíny, hemmaglutiníny a rôzne proteíny), pri štúdiu aktivity enzýmov, pri detekcií vírusov a baktérií. 1

Techniky ako EIS, AFM a SPR boli použité pre charakterizáciu glykánového biosenzora, ktorý bol schopný detekcie glykán-proteínových interakcií na aM (10-18) úrovni medzi imobilizovaným glykánom a lektínom (MAA, DSL) a hemmaglutinínom vírusu chrípky. Povrch jedného z nacistlivejších dosiaľ publikovaných glykánových biosenzorov bol modifikovaný 11-merkaptoundekánovou kyselinou a 1-merkpto-6-hexanolom, glykán s terminálnou kyselinou sialovou bol imobilizovaný na SAM vrstvu cez amínovú väzbu. 4

V druhom pokuse sa povrch modifikoval tiolmi, ktoré obsahovali etylénglykolové (EG) skupiny. Takto modifikovaný povrch s imobilizovaným glykánom sa použil na detekciu inaktívnych vírusov chrípky H3N2 a H7N7.

Literatúra:

1. Hushegyi A. and Tkáč J. (2014). Are glycan biosensors an alternative to glycan microarrays? *Anal. Methods*, 6, 6610-6620.
2. Tkac J., Bertok T., Nahálka J. and Gemeiner P. (2014). Perspectives in glycomics and lectin engineering. *Methods Mol. Biol.*, 1200, 421-445.
3. Liu L., Deng D., Xing Y., Li S., Yuan B., Chen J. and Xia N. (2013). Activity analysis of the carbodiimide-mediated amine coupling reaction on self-assembled monolayers by cyclic voltammetry. *Electrochim. Acta*, 89, 616–622.
4. Hushegyi A., Bertok T., Damborsky P., Katrik J. and Tkac J. (2015). An ultrasensitive impedimetric glycan biosensor with controlled glycan density for detection of lectins and influenza hemagglutinins. *Chem. Commun.*, 51, 7474 – 7477.

Podakovanie: Táto publikácia bola vytvorená v rámci projektov VEGA 2/0162/14, ERC 311532 a bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0282-11.

Optimalizácia postupu analýzy glykoproteínov pomocou glykánovej microarray využívajúcej lektíny

Zámorová Martina¹, Holazová Alena¹, Nedić Olgica², Katrlík Jaroslav¹

¹ *Chemický ústav, Oddelenie glykobiotechnológie, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika*

² *Institute for the Application of Nuclear Energy, University of Belgrade, Benatska 31b, Zemun, Serbia*

Glykozylácia proteínov predstavuje jednu z najuniverzálnejších a najčastejších ko-translačných a post-translačných modifikácií proteínov. Sacharidové časti glykoproteínov sa zúčastňujú mnohých biologicky dôležitých procesov, ako napríklad fertilizácie, bunkového vývoja a diferenciacie, interakcií hostiteľa s patogénom rovnako pri progresii mnohých ochorení. Množstvo a kvalita glykozylácie, ako aj zmeny v glykánových štruktúrach môžu slúžiť ako dôležité biomarkery signalizujúce nástup a priebeh mnohých ochorení. Glykoprolácia by tiež mohla slúžiť ako nástroj pre skorú diagnostiku. Na rýchlu analýzu glykozylačného profilu sa používa (glyko)proteínová microarray využívajúca lektíny, proteíny, ktoré sú schopné špecificky a reverzibilne viazať glykány. (Glyko)proteíny sú imobilizované na pevný povrch s využitím vhodnej povrchovej chémie, po imobilizácii sa zablokujú neobsadené aktívne skupiny a pridajú sa biotinylované lektíny, ktoré špecificky interagujú s glykánovými štruktúrami. Detekčný systém môže byť založený na interakcii biotínu s konjugátom streptavidín - fluorofór (nepriama detekcia) alebo s lektínom priamo označeným fluorescenčnou značkou. Cieľom tejto práce bolo optimalizovať (glyko)proteínovú microarray využívajúcu lektíny pre detekciu a glykoproláciu proteínov. Ako analyty sme využili štandardný glykoproteín fetuín, bunkové lyzáty a imunoprecipitáty zo vzoriek od pacientov s kolorektálnym karcinómom. Testovali sme rôzne experimentálne postupy pre spotovanie, blokovanie a inkubáciu, ako aj rôzne techniky nanášania vzoriek.

Literatúra:

1. Apweiler, R., et al., On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1999. 1473(1): p. 4-8.
2. Hirabayashi, J., Concept, Strategy and Realization of Lectin-based Glycan Profiling. *Journal of Biochemistry*, 2008. 144(2): p. 139-147.
3. Katrlík, J., et al., Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications. *Medicinal Research Reviews*, 2010. 30(2): p. 394-418.

Podakovanie: Táto práca bola realizovaná vďaka grantom VEGA 2/0162/14 a APVV SK-SRB-2013-0028.

Studium glykosylačných zmien u nádorových onemocnění s pomocí microarray

Holazová Alena¹, Zámorová Martina¹, Nedić Olgica², Katrlík Jaroslav¹

¹ *Chemický ústav, Oddelenie glykobiotechnológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, Bratislava, 845 38*

² *Institute for the Application of Nuclear Energy, University of Belgrade, Benatska 31b, Zemun, Serbia*

Změny v glykosylaci jsou pozorované při změnách fyziologického stavu, tyto změny jsou doprovázeny různými nemocemi (rakovina, roztroušená skleróza, AIDS a mnoho dalších). Pro studium glykosylačných změn jsme použili lektinovou microarray. Tato metoda umožňuje měření velkého množství vzorek v relativně krátkém čase. Použité množství vzorek se pohybují v řádech několika μl . Během měření byly vzorky inkubovány s biotinylovanými lektiny, které byly následně označeny fluorescenční značkou spolu se streptavidinem a poté skenovány a vyhodnoceny.

Pro studium glykosylačných změn byly použity různé typy humánních vzorků: séra získaná od zdravých lidí a od pacientů, cytosol, membránové frakce, vzorky ze zdravé části tlustého střeva pacienta, ale i z postižené tkáně, IGFBP-3 a $\alpha 2$ -makroglobulinu jako imunoprecipitáty získané ze sér, cytosolu a membránových frakcí. Celkově bylo změřeno 208 různých vzorků získaných od 20 zdravých lidí a od 30 osob s diagnostikou kolorektálního karcinomu. U všech vzorků byly sledovány interakce s 16 různými lektiny (s různými vazebnými specifitami, př. α -D-Sia-(2-3)-Gal, α -D-Sia-(2-6)-Gal, α -D-Man, α -L-Fuc-(1-6)-GlcNAc, GalNAc, atd.). Po statistickém vyhodnocení vzorek byl pozorován určitý trend při změnách glykosylace spojený s kolorektálním karcinomem. Tyto výsledky poukazují na možnost využití tohoto biosenzoru jako na vhodného kandidáta (glyko)biomarkeru v diagnostice kolorektálního karcinomu.

Literatúra:

1. Šunderić M., Šedivá A., et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015
2. Bertók T., Kluková M., Šedivá A., Kasák P., et al., *Anal. Chem.*, 2013
3. Bertók T., Šedivá A., et al., *Talanta*, 2013
4. Katrlík J., Švitel J., et al. *Medical research reviews*, 2010

Pod'akovanie: Tato práce byla realizovaná díky grantu VEGA 2/0162/14 a APVV SK-SRB-2013-0028.

Sekundárny metabolizmus vo fyziológii *Trichoderma* sp.

Palušková Veronika¹, Kryštofová Svetlana¹, Stanová Iveta¹, Kaliňák Michal², Cocuľová Martina³

¹ Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava

² Oddelenie NMR a hmotnostnej spektrometrie, Ústav analytickej chémie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava

³ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 83334 Bratislava

Huby rodu *Trichoderma* sú askomycétne vláknité huby známe aj vďaka ich schopnosti produkovať širokú škálu sekundárnych metabolitov. V mykoparazitickom spôsobe života *Trichoderma* spp. zohrávajú tieto látky významnú úlohu, menej známa je však ich funkcia vo fyziológii. Množstvo sekundárnych metabolitov je syntetizovaných prostredníctvom multidoménoých enzýmov- syntáz polyketidov (PKS). Do skupiny polyketidov patria aj pigmenty produkované vláknitými hubami, vrátane húb rodu *Trichoderma* (1). Biochemické dráhy syntézy pigmentov a ich regulácia zostáva u väčšiny húb neobjasnená.

UV mutagenézou *Trichoderma atroviride* CCM F-534 boli pripravené biele, žlté a hnedé mutanty, ktoré boli následne fenotypovo charakterizované. V genómoch *Trichoderma* spp. boli pomocou bioinformatických metód identifikované hypotetické gény kódujúce syntázy polyketidov. Následne boli v genóme *T. atroviride* IMI 206040 vyhľadané hypotetické PKS homológne k *pk4*, zodpovednej za syntézu zeleného pigmentu v *T. reesei* (2). Osekvenovaním homológnej *pk4* v genómoch mutantov so zmenenou pigmentáciou, sa potvrdila prítomnosť mutácie v bielych mutantoch. Hnedé mutanty sú charakteristické tvorbou hnedosfarbených konídií a sekréciou oranžového a hnedého pigmentu. NMR analýzou oranžového pigmentu bola identifikovaná látka patriaca do skupiny polyketidov, ktorá je známa ako rodolamprometrín (3). Gény zasiahnuté UV mutagenézou v žltých a hnedých mutantoch zatiaľ neboli identifikované.

Literatúra:

1. Druzhinina, I. S. a kol.: *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature, Microbiology* 9, 2011, s. 749-759
2. Atanasova, L. a kol.: The polyketide Synthase *pk4* of *Trichoderma reesei* Provides Pigmentation and Stress Resistance. *Eucaryotic cell* 12, 2013, s. 1499-1508
3. Kryštofová, S. a kol.: The molecular hardware of fungal polyketide biosynthesis. ISeC 2015

Podakovanie: Táto práca bola podporená APVV-0719-12 a VEGA-1/0870/14.

Vývoj rýchlej a optimalizovanej metódy určenej pre mikrobiálnych producentov inhibítorov lipáz

Híreš Michal, Kryštofová Svetlana, Šimkovič Martin, Rapavá Nora, Varečka Ľudovít

Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava

Mikroorganizmy sú zdrojom mnohých priemyselne zaujímavých látok. Hoci dopyt po nich je často krát veľký, väčšina z nich je produkovaná len v malých množstvách. Príkladom je lipstatín, inhibítor tráviacich lipáz, ktorý si našiel uplatnenie v medicíne, najmä pri liečbe obezity. Hlavným mikrobiálnym zdrojom je vláknitá baktéria *Streptomyces toxytricini*. Lipstatín je prirodzene produkovaný len v malých množstvách, navyše len časť je uvoľňovaná do okolia. Vzhľadom na narastajúci výskyt obezity a relatívnu neškodnosť lipstatínu, sú snahy získať kmeň so zvýšenou produkciou tohto sekundárneho metabolitu. Pri využití oboch postupov, či už náhodného alebo cieleného pozmenenia genómu, sa získa väčšie množstvo mutantov, ktoré je potrebné rýchlo a efektívne otestovať, či majú zvýšenú biosyntézu tejto látky. Preto sme vyvinuli dva systémy na skrining. Jeden je založený na pH indikátoroch, druhý používa chromogénne substráty. V prvej fáze sa hľadali vhodné zložky a podmienky pre navrhnuté systémy. Sledovala sa lipolytická aktivita rôznych lipáz (lipáza A, AYS, G, M, L1 a L2), pri rôznych teplotách (8; 15; 27; 32; 45 a 58 °C) a pH (3,5; 4,5; 6; 7,5; 9 a 10) s cieľom vybrať lipázu s najvyššou mierou inhibície tetrahydrolipstatínom (stabilnejší derivát lipstatínu) a určiť optimálnu teplotu a pH pre vybrané lipázy. Následne sa stanovila termálna stabilita (23, 37, 50 a 70 °C). Ďalej sa sledoval vplyv detergentov (Brij-35; deoxycholan sodný; Triton X-100 a Tween 80). Ako substrát pre lipázu sa využil komerčne dostupný p-nitrofenyldodekanát. V druhej fáze sa s vhodnou lipázou (lipáza M) a pri najlepších podmienkach (37 °C; pH=7,5; Tween 80) porovnávali vlastnosti rôznych pH indikátorov (brómfenolová modrá; brómkrezolová zelená; brómtymolová modrá; metylčerveň). Dostatočnú farebnú zmenu v neutrálnej oblasti sme pozorovali pri brómtymolovej modrej. Na základe získaných poznatkov, systém založený na farebnej zmene pH indikátora obsahoval brómtymolovú modrú, lipázu M, Tween 80 a metylester sójového oleja (MESO) ako substrát. Druhý systém obsahoval namiesto pH indikátora chromogénny substrát, ktorého farebná zmena bola detegovaná.

Podakovanie: Táto práca bola finančne podporená grantom APVV-0719-12 a štrukturálnym fondom ITMS 26220220093.

***Trichoderma atroviride* a jej vzťah k Ca²⁺ iónom**

Tomáš Molnár, Martin Šimkovič, Ľudovít Varečka

Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava

Ca²⁺ ióny sú dôležité signálne molekuly, ktoré sa v živých bunkách prostredníctvom modulácie aktivity enzýmov a vlastností bielkovín podieľajú na regulácii mnohých životne dôležitých bunkových procesov. Charakteristickou vlastnosťou živých buniek je nízka koncentrácia voľných Ca²⁺ iónov v cytoplazme, ktorá sa v dôsledku mimo- alebo vnútro-bunkových biotických a abiotických podnetov prechodne zvýši. Zvýšenie koncentrácie spôsobí naviazanie Ca²⁺ na špecifické bielkoviny a aktiváciu príslušnej signálnej dráhy. Významnú úlohu pri zabezpečovaní Ca²⁺ homeostázy v bunkách hrajú Ca²⁺ transportné proteíny a regulačné proteíny viažuce Ca²⁺. Vlákňité huby reprezentujú spomedzi eukaryotických organizmov zaujímavý experimentálny model, ktorý sa vyznačuje charakteristickou mnohobunkovou architektúrou a schopnosťou tvoriť špecializované bunkové typy v priebehu ich sexuálneho alebo asexuálneho spôsobu života. Vlákňité huby z rodu *Trichoderma* sa využívajú ako modelové organizmy pri štúdiu konidiogenézy a mykoparazitizmu. V súčasnosti majú veľký význam aj v biologickej ochrane poľnohospodárskych rastlín a sú významnými producentmi homológnych (celulázy) a heterológnych proteínov. Pokusy v našom laboratóriu naznačujú, že viaceré fyziologické javy u *Trichoderma atroviride* sú spojené s Ca²⁺ iónmi. Zatiaľ nie je jasná podstata ako sa vstup Ca²⁺ do mycélia tejto huby uskutočňuje. Cieľom tejto práce je skúmanie potencionálnych bielkovín, zabezpečujúcich transport Ca²⁺ do mycélia *T. atroviride*.

PodĎakovanie: Táto práca bola finančne podporená grantom APVV-0719-12.

Nové aspekty v pôsobení karbamidových antimykobakteriálnych liečiv

Madacki Jan, Korduláková Jana

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Pôvodca tuberkulózy - patogénna baktéria *Mycobacterium tuberculosis* v súčasnosti ohrozuje ľudstvo najmä v rozvojových krajinách. Celosvetový výskyt mnohonásobne rezistentných kmeňov tohto patogéna (MDR-TB) a ich rýchle šírenie však dokazuje, že tuberkulóza zostáva globálnym problémom (1). Liečba tuberkulózy štandardne zahŕňa podávanie štyroch antituberkulotík po dobu 6 až 9 mesiacov, pričom v prípade MDR-TB môže liečba trvať až dva roky. Vzhľadom na početné nežiaduce účinky, ktoré sprevádzajú tento spôsob liečby, ako aj zvyšujúcu sa odolnosť tuberkulózneho bacila voči existujúcim liečivám je potrebný neustály vývin nových antituberkulotík.

Medzi účinné antimykobakteriálne inhibítory patria látky, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú modifikované karbamidové (ureové) jadro. Mechanizmus pôsobenia viacerých z nich už bol aspoň čiastočne objasnený - inhibujú syntézu a transport mykolových kyselín, veľmi dlhých mastných kyselín ktoré sú esenciálnou súčasťou mykobakteriálnej bunkovej steny. Tioureové deriváty izoxyl (ISO) a tiacetazón (TAC) sa kovalentne viažu na dehydratázy HadAB/HadBC, ktoré katalyzujú dehydratačný krok v biosyntéze mykolových kyselín mykobakteriálnym FAS II systémom (2), pričom vyžadujú aktiváciu pôsobením mykobakteriálnej monooxygenázy EthA (2, 3). Izoxyl v mykobaktériách inhibuje aj ďalší cieľ – $\Delta 9$ desaturázu DesA3, zodpovednú za syntézu kyseliny olejovej (4). Adamantylurea AU-1235 inhibuje transport mykolových kyselín vo forme esteru trehalózy – trehalózamonomykolátu (TMM) cez plazmatickú membránu prostredníctvom proteínu MmpL3 (5). Neskoršie práce ukázali, že tento inhibičný efekt je pravdepodobne zapríčinený narušením transmembránového elektrochemického protónového gradientu (6). Viaceré deriváty karbamidu sú klinicky využívané aj ako inhibítory cicavčích epoxidhydroláz, enzýmov hydrolyzujúcich epoxidy na vicinálne dioly (7). V in vitro podmienkach tieto zlúčeniny inhibujú aj dve z mykobakteriálnych epoxidhydroláz - EphB a EphE kódované génmi z *M. tuberculosis* (8). Ďalšia z mykobakteriálnych epoxidhydroláz, proteín EphD sa zúčastňuje metabolizmu mykolových kyselín v nepatogénnom kmeni *M. smegmatis*, ako aj v patogénnom kmeni *M. tuberculosis* (Madacki a Korduláková, nepublikované výsledky). Zaujímalo nás preto, či uvedená epoxidhydroláza nie je jedným z cieľov karbamidových inhibítorov v mykobaktériách.

Inhibičný efekt látok ISO, TAC, AU-1235, ako aj DA5 – ktorá rovnako ako AU-1235 inhibuje transport TMM, avšak nepatrí ku karbamidovým zlúčeninám – na epoxidhydrolázovú aktivitu proteínu EphD z *M. tuberculosis* a jeho ortológu MSMEG_4280 z *M. smegmatis* sme testovali v in vitro podmienkach použitím rádioaktívne značeného generického substrátu. Zároveň sme testovali, či prídanie monooxygenázy EthA do týchto reakčných zmesí stimuluje inhibičný efekt študovaných látok. Produkty reakcií sme po extrakcii analyzovali pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC). Účinok testovaných látok na epoxidhydrolázovú aktivitu EphD a MSMEG_4280 sme analyzovali aj priamo v bunkách *M. smegmatis* nadproduktujúcich tieto proteíny, pričom sme z buniek príslušných kmeňov kultivovaných v prítomnosti študovaných zlúčenín izolovali mykolové kyseliny a pomocou TLC sme analyzovali zmeny v ich profile.

Naše výsledky dokazujú, že kým látka DA5 neinhibuje aktivitu študovaných epoxidhydroláz, ISO, TAC a AU-1235 v in vitro podmienkach inhibujú epoxidhydrolázovú aktivitu oboch proteínov, a to bez potreby aktivácie monooxygenázou EthA. Uvedené látky inhibujú aktivitu proteínov EphD a MSMEG_4280 aj priamo v bunkách *M. smegmatis* nadproduktujúcich tento proteín.

Litaratúra:

1. WHO (2014) Global tuberculosis report 2014, WHO Press, Geneva.
2. Grzegorzewicz, A. E., et al. (2015) ACS Infect Dis 1, 91–97
3. Korduláková, J., et al. (2007) Antimicrob Agents Chemother 51(11), 3824-9
4. Phetsuksiri, B., et al. (2003) J Biol Chem 278, 53123–30
5. Grzegorzewicz, A. E., et al. (2012) Nat Chem Biol 8, 334–341
6. Li, W., et al. (2014) Antimicrob Agents Chemother 58(11), 6413-23
7. Morisseau, C., et al. (2002) Biochem Pharmacol 63, 1599–1608
8. Brown, J. R., et al. (2011) Bioorg Med Chem 19(18), 5585-95

Pod'akovanie: Práca vznikla s finančnou podporou grantu VEGA 1/0284/15

Analýza vplyvu CoCl_2 na ubikvitín-proteazomálny systém a hladinu expresie proteínov HSP70.

Katarína Dibdiaková, Simona Saksonová, Ivana Pilchová, Katarína Klačanová, Peter Račay

Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Malá hora 4D, 036 01 Martin

Úvod:

Kyslík okrem funkcie konečného akceptora elektrónov v dýchacom reťazci má tiež nenahraditeľnú úlohu ako signálna molekula. Je dôležitým regulátorom funkcie niektorých enzýmov. Jedným z nich je enzým prolyl-hydroxyláza (PHD), ktorý pre svoju funkciu hlavného regulátora kyslíkovej homeostázy vyžaduje okrem kyslíka tiež prítomnosť Fe^{2+} , 2-oxoglutarátu a askorbátu.

Farmakologicky využívané inhibítory PDH sú schopné regulovať angiogenézu, glykolýzu, erytropoézu či apoptózu v snahe ovplyvňovať ischemicko-reperfúzne poškodenie tkaniva (1). Chlorid kobaltnatý (CoCl_2) ako jeden z inhibítorov PHD má schopnosť navodiť tzv. chemickú hypoxiu. CoCl_2 a s ním súvisiaci hypoxický stres sa dáva tiež do súvisu s poškodením mitochondriálnych proteínov (2,3), avšak presnejšie mechanizmy jeho účinkov v súčasnosti nie sú uspokojivo preskúmané. Aj keď hlavnou úlohou PHD je hydroxylácia prolínov hypoxiou indukovaného faktora (HIF), ktorá vedie k jeho proteazomálnej degradácii, my sme sa zamerali na sledovanie vplyvu tohto inhibítora na expresiu proteínov HSP70 a akumuláciu ubikvitín-konjugovaných bielkovín.

Materiál a metódy:

Ako model sme použili neuroblastómovú bunkovú líniu SH-SY5Y (ATCC,USA), ktorú sme kultivovali v kultivačnom médiu MEM+F12 1:1 obohatenom o 10% FBS a zmes ATB. Bunky boli inkubované v 5% CO_2 atmosfére pri 37°C. Bunkovú líniu sme vystavili účinku chloridu kobaltnateho v rôznych časových intervaloch a koncentráciách. Následne sme pomocou cytotoxického metyl-tiazol tetrazoliového (MTT) testu stanovili relatívnu mieru prežívania buniek po inkubácii s rôznymi koncentraciami CoCl_2 . Bielkoviny získané z bunkových lyzátov sme separovali pomocou SDS-PAGE elektroforézy a hladiny jednotlivých sledovaných proteínov sme analyzovali metódou Western Blot.

Výsledky a diskusia:

V našich pokusoch sme pracovali s viacerými koncentraciami CoCl_2 , ktoré pôsobili na bunky v rôznych časových intervaloch; 30 min CoCl_2 , 30 min CoCl_2 + 3 h KM (kultiv. médium), 3h

CoCl₂, 30 min CoCl₂ + 24 h KM, 24 h CoCl₂, 48 h CoCl₂ a kontrolné bunky lyzované po 24 hodinách. Western blotovou analýzou sme zistili zvyšujúcu sa mieru hladiny expresie HSP70 v závislosti od času pôsobenia CoCl₂ na bunkovú kultúru. Hladina expresie HSP70 sa zvyšovala s predĺžením pôsobenia CoCl₂, pričom najvyššia indukcia HSP70 bola v bunkách so 48 hodinovou expozíciou induktoru. CoCl₂ postupne indukoval bunkovú smrť a to najmä vo vyšších koncentráciách. V jednotlivých časových závislostiach sme pozorovali tiež rôznu mieru akumulácie proteínov konjugovaných s ubikvitínom a teda pravdepodobný vplyv PHD na aktivitu UPS (ubikvitín-proteazomálneho systému) v odpovedi na chemicky vyvolanú hypoxiu.

Záver:

Na záver môžeme skonštatovať, že CoCl₂ indukoval expresiu molekulárných chaperónov rodiny HSP70 a tiež rôznu mieru akumulácie proteínov konjugovaných s ubikvitínom. Otázkou však zostáva, či je zvyšujúca sa expresia HSP70 spôsobená priamo inhibíciou PHD, alebo k nej dochádza kvôli narušeniu ubikvitín-proteazomálneho systému bunky, nakoľko inhibícia UPS vedie k zvyšovaniu hladín HSP70.

Literatúra:

1. Selvaraju V., Parinandi N.L., Adluri R. S., Goldman J. W, Hussain N., Sanchez J.A. , Maulik N.; Molecular Mechanisms of Action and Therapeutic Uses of Pharmacological Inhibitors of HIF–Prolyl 4-Hydroxylases for Treatment of Ischemic Diseases; (2014), ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, Volume 20, Number 16, 2014 DOI: 10.1089/ars.2013.5186
2. Wang G., Hazra T.K., Mitra S., Lee H.M., Englander E.W.; (2000), Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl(2) in rat neuronal PC12 cells. Nucleic Acids Res 28:2135–2140.
3. Karovic O., Tonazzini I., Rebola N., Edstrom E., Lovdahl C. et al.; (2007), Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1alpha. Biochem Pharmacol 73:694–708.

Podakovanie: Práca bola podporená APVV grantom č. 0245-11.

Štúdium neuroprotektívnych mechanizmov bielkovín tepelného šoku

Saksonová Simona, Dibdiaková Katarína, Pilchová Ivana, Klačanová Katarína, Račay Peter

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 036 01, Martin, Slovenská Republika

Úvod:

Pokrok v štúdiu molekulárnej podstaty neuroprotektívnych účinkov prostredníctvom bielkovín tepelného šoku je potenciálnou možnosťou pre vývin terapií neurodegeneratívnych ochorení asociovaných so zmenou štruktúry a tvorbou vysokomolekulových agregátov proteínov [1]. Konformačné zmeny proteínov a vznik agregátov boli pozorované pri ischemicko-reperfúznom poškodení CNS, preto nadexpresia bielkovín tepelného šoku môže zvýšiť toleranciu na ischémiu prostredníctvom kontroly abnormálnych proteínov a inhibície apoptózy [2].

Cieľom práce je indukcia expresie heat shock proteínu 70 (HSP70) prostredníctvom valproovej kyseliny, ktorá sa používa ako antikonvulzívum s pozitívnymi účinkami v terapii klinickej depresie a záchvatov. Patrí k inhibítorm histónových deacetyláz a predpokladá sa, že prostredníctvom indukcie HSP70 v kortikálnych neurónoch má neuroprotektívne a terapeutické účinky [3]. Na základe tohto predpokladu sme sa rozhodli využiť pôsobenie valproovej kyseliny v dvoch cytotoxických modeloch - s neuroblastómovou líniou ovplyvnenou terapeutikom inhibujúcim proteazóm (velcade) alebo s N-methyl-D-asparagovou kyselinou (NMDA), ktorá vyvoláva excitotoxicitu.

Materiál a metódy:

Ľudská neuroblastómová bunková línia SH-SY5Y bola kultivovaná s použitím kultivačného média Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 v teplote 37°C a s prísunom 5% CO₂. Bunky boli ovplyvnené zvolenými koncentráciami valproovej kyseliny potom boli pripravené bunkové lyzáty po časovo závislej inkubácii buniek s valproovou kyselinou. Koncentrácie proteínov boli stanovené Bradfordovou metódou a proteíny vo vzorkách boli separované SDS-PAGE elektroforézou. Western blot analýza bola použitá na prenos proteínov na nitrocelulóзовú membránu. Následne boli proteíny detekované pomocou komerčne dostupných protilátok proti HSP70. Na sledovanie relatívnej miery prežívania buniek v závislosti od koncentrácie a dĺžky expozície valproovej kyseliny bol použitý MTT test. MTT testom bolo stanovené aj relatívne prežívanie buniek po

štvorhodinovom predchádzajúcom ovplyvnení buniek valproovou kyselinou a s následným pridaním velcade alebo s NMDA.

Výsledky a diskusia:

Pomocou Western blot analýzy sme sledovali tendenciu zvyšovania indukcie HSP70 po 4 a 8 hodinách pôsobenia valproovej kyseliny pri koncentráciách 1; 2,5 a 5 mM. Účinok rôznych koncentrácií (0,25 - 15 mM) valproovej kyseliny sme pozorovali na prežívaní neurónov pomocou MTT testu vzhľadom na kontrolu bez terapeutika. V časovej závislosti sme zistili, že valproová kyselina má pozitívny vplyv na prežívanie buniek takmer vo všetkých koncentráciách (0,25 – 7,5 mM) v čase 24 hodín po ovplyvnení. V čase 48 hodín a 72 hodín sa percento prežívania znižovalo od 5 mM koncentrácie. Na sledovanie prežívania buniek pri kombinovaní terapeutík sme zvolili konštantnú koncentráciu valproovej kyseliny (2,5 mM) a koncentráciu velcade 1 – 50 nM. Na základe výsledkov môžeme skonštatovať, že kyselina valproová nevykazovala neuroprotektívny účinok. Pri kombinovaní valproovej kyseliny s NMDA sme použili 0,08 – 2 μ M koncentráciu NMDA. V tomto prípade sme zaznamenali negatívny efekt na prežívanie buniek.

Záver:

Výsledky tejto práce prispeli k predpokladu, že valproová kyselina indukuje HSP70 v neuronálnych bunkách, napriek tomu výsledky kombinácie valproovej kyseliny s velcade ani s NMDA nepreukázali jej neuroprotektívny účinok.

Litaratúra:

- [1] Halliday M, Mallucci GR. Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: A new approach to therapy. *Neuropharmacology*. 2014. 76:169-174.
- [2] Nishino K, Nowak TS Jr. Time course and cellular distribution of hsp27 and hsp72 stress protein expression in a quantitative gebril model of ischemic injury and tolerance: thresholds for hsp72 induction and hilar lesioning in the context of ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2004;24:167-178.
- [3] Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol*. 2014. 2010:1-18.

Podakovanie: Práca bola podporená APVV grantom č. 0245-11.

Vplyv materského stresu na kvalitu blastocýst izolovaných z matiek s rozdielnym obsahom telesného tuku.

Janštová Žofia, Burkuš Ján, Kubandová Janka, Fabian Dušan, Koppel Juraj, Čikoš Štefan

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 04001 Košice, Slovensko

Stres a obezita patria k najrozšírenejším civilizačným ochoreniam a môžu patriť k príčinám spôsobujúcim pokles plodnosti ľudskej populácie vo vyspelých krajinách. V tejto práci sme skúmali účinky stresu v kontexte metabolického stavu materského organizmu. Pre získanie matiek s rozdielnym obsahom telesného tuku bol použitý dvojgeneračný model založený na prekrmovaní počas vnútro maternicového a skorého postnatálneho obdobia. Matky s rozdielnym obsahom telesného tuku (normálny – fyziologický, mierne zvýšený, výrazne zvýšený a nízky obsah tuku) boli vystavené pôsobeniu imobilizačného stresu a boli u nich vyšetrované preimplantačné embryá. Analyzovali sme bazálne a stresom indukované koncentrácie vybraných hormónov v krvi, pričom sme zaznamenali odlišné reakcie na stres u samíc s fyziologickým obsahom telesného tuku a u samíc s pozmeneným obsahom telesného tuku. Analýza počtu izolovaných embryí a prechodu embryí z vajcovodu do maternice neukázala významné rozdiely medzi jednotlivými skupinami matiek. Avšak u matiek s výrazne vysokým alebo výrazne nízkym obsahom telesného tuku sme zaznamenali signifikantne vyšší počet blastocýst obsahujúcich mŕtve bunky v porovnaní s matkami s fyziologickým alebo len mierne zvýšeným obsahom telesného tuku. Tieto výsledky ukazujú, že vplyv materského stresu na skoré embryo môže závisieť od aktuálneho fyziologického stavu materského organizmu.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-0815-11 a VEGA 2/0039/15.

Zoznam účastníkov

Štefan	Belický	stefan.belicky@savba.sk
Monika	Burikova	burikovamonika@gmail.com
Martina	Cocuľová	martina.coculova@stuba.sk
Katarína	Dibdiaková	k.dibdiakova@gmail.com
Marián	Grman	grman.marian@gmail.com
Michal	Híreš	xhires@stuba.sk
Alena	Holazová	chemseda@savba.sk
Ľudmila	Hrehová	ludmila.hrehova1@gmail.com
András	Hushegyi	a.hushegyi@gmail.com
Stanislav	Huszar	stanislav.huszar@gmail.com
Daniela	Jamrichova	jamrichova.daniela@gmail.com
Žofia	Janštová	janstova@saske.sk
Zuzana	Ježíková	zuz.jezikova@gmail.com
Barbora	Kaločayová	barbora.kalocayova@gmail.com
Zuzana	Kaňková	kankova@fns.uniba.sk
Katarína	Klačanová	klacanova@jfmed.uniba.sk
Ľudmila	Kluková	ludmila.klukova@savba.sk
Kristína	Kováčová	kristina.kovacova@savba.sk
Andrea	Kuchtová	Andrea.Kuchtova@savba.sk
Nina	Kunová	nina.kunova@savba.sk
Lucia	Lapínová	lucia.lapinova@savba.sk
Jan	Madacki	jan.madacki@gmail.com
Mária	Martinovičová	ing.martinovicova.maria@gmail.com
Matej	Maťaťa	mmatata5@gmail.com
Lucia	Messingerova	lucia.messingerova@savba.sk
Anton	Mišák	anton.misak@savba.sk
Tomáš	Molnár	molnartomi.molnr@gmail.com
Roman	Moravčík	moravcikr@fns.uniba.sk
Tomáš	Pagáč	tomaspagac1@gmail.com
Zuzana	Pakanová	zuzana.pakanova@savba.sk
Veronika	Palušková	paluskova.v@gmail.com
Lucia	Pavlikova	lucia.pavlikova13@gmail.com
Ivana	Pilchová	iv.pilchova@gmail.com
Simona	Saksonová	sim.saksonova@gmail.com
Lenka	Tomášová	tomasova@fpharm.uniba.sk
Lucia	Toporová	lucia.toporova@savba.sk
Katarína	Turáková	katarina.turakova@stuba.sk
Martina	Zámorová	zamorovamartina@gmail.com

Odborná komisia

1.	RNDr. Mária BALÁŽOVÁ, PhD.	Maria.Simockova@savba.sk
2.	RNDr. Imrich Barák, DrSc.	imrich.barak@savba.sk
3.	doc. Ing. Albert Breier, DrSc.	albert.breier@stuba.sk
4.	prof. RNDr. Peter Fedoročko, CSc.	peter.fedorocko@upjs.sk
5.	doc. MVDr. Juraj Koppel, DrSc.	koppel@saske.sk
6.	doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.	boris.lakatos@stuba.sk
7.	doc. RNDr. Peter Račay, CSc.	racay@jfmed.uniba.sk
8.	RNDr. Ján SEDLÁK, DrSc.	jan.sedlak@savba.sk
9.	Ing. Zdena Sulová, DrSc.	zdena.sulova@savba.sk
10.	prof. Ing. Peter ŠIMKO, DrSc.	peter.simko@stuba.sk

Sponzori Drobnicovho memoriálu

1. ProScience Tech, s.r.o.	 The logo for ProScience Tech features a stylized blue circular icon on the left, followed by the text "ProScience Tech" in a bold blue font. Below this, the tagline "Integrated solutions for science and research labs" is written in a smaller, lighter blue font.
2. BioTech, a.s.	 The BioTech logo consists of a red rectangular background. On the left, the text "www.Bi" is written in white, and on the right, "Tech.CZ" is written in white with a blue outline. A stylized blue and white graphic element is positioned between the two text parts.
3. Sarstedt	 The Sarstedt logo features a red square icon containing a white stylized letter 'S' on the left, followed by the word "SARSTEDT" in a bold, red, sans-serif font.
4. Sanitas Slovakia	 The Sanitas Slovakia logo features a graphic of vertical blue bars of varying heights, with a small red dot above one of the bars. Below the graphic, the text "SANITAS SLOVACA" is written in a bold, black, sans-serif font, and "agentúra pre rozvoj zdravia na Slovensku, o.z." is written in a smaller, black, sans-serif font below that.
5. Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.	 The Eppendorf logo consists of the word "eppendorf" in a bold, blue, lowercase, sans-serif font.

DROBNICOV MEMORIÁL 8. ročník
23. – 25. september 2015
Horský hotel Smrekovica, Podsuchá

ISBN 978-80-970164-8-7

Redakčná úprava: doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.

© Vydal: Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2015