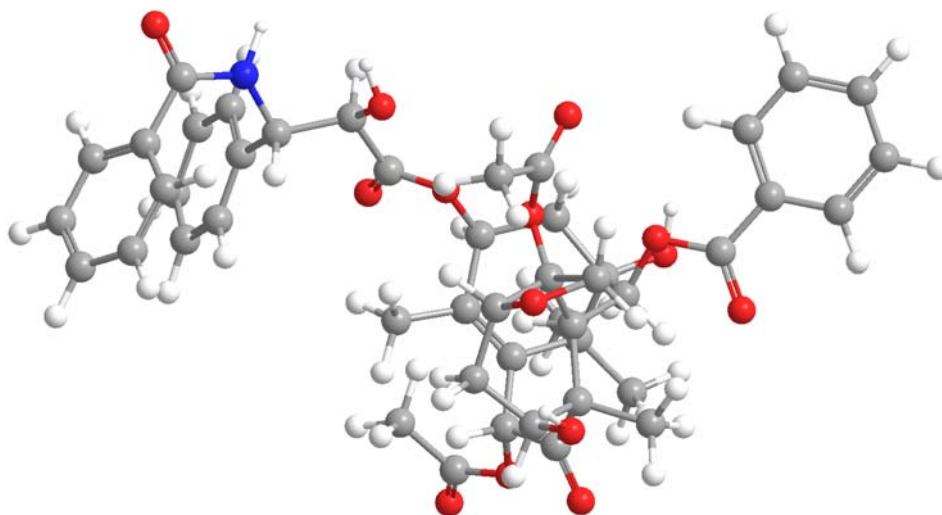




**SIGMA-ALDRICH**



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

25.5. – 28.5. 2010

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali  
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

## X. JUBILEJNÍ MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ

Před třemi lety jsem na tomto místě slibovala, že převezmu štafetu organizování konference, která se v letošním roce bude konat již po desáté. Též jsem vyslovila přání, abychom účast na této konferenci rozšířili o mladé vědce ze Slovenska.

U příležitosti každého jubilea dochází obvykle k pohledu zpět a k určitému bilancování a tak si dovoluji i já při tom ještě poměrně mladém jubileu o trochu hodnocení.

Na začátku stála myšlenka svést dohromady mladé vědce a dát jim příležitost předvést si navzájem, čím se zabývají, tzv. se otrkat, osvojit si techniku a dovednosti při prezentaci své práce, ale i prostě pobýt společně na příjemném místě a navázat kontakty s kolegy z příbuzných oborů a pracovišť.

Chlubiti se vlastními úspěchy sice není příliš vhodné, nicméně ohlasy i komentáře jiných (a především účastníků samých) potvrzují, že tzv. „Amerika“, jak ji rád nazývá Pavel Drašar podle místa konání jedné z prvních, je akce opravdu úspěšná. Mnozí z těch, kteří byli na konferenci ohodnoceni jako nejlepší, úspěšně pokračují ve vědecké kariéře a jsem ráda, že v mnoha případech ocenění na této konferenci přispělo alespoň v malé míře k těmto úspěchům.

Podarilo se již přivést na konferenci také mladé kolegy ze Slovenska a odborná komise má již po třetí alespoň jednoho člena právě ze Slovenska. Sice ještě trochu váhavý, nicméně viditelný nárůst slovenských účastníků, mě vede k víře, že akce již překonala česko-slovenskou hranici.

K jubilejnímu bilancování patří ovšem též dík těm, kteří každoročně neváhají obětovat svůj volný čas k přípravě akce, výběru účastníků, jejich hodnocení i výběru těch nejlepších. Je to především již zmíněná odborná komise, jíž patří velký dík za její práci a vytrvalost, jsou to kolegové z chemické i biochemické společnosti, kteří akci podporují a v neposlední řadě též pracovníci naší firmy, kteří organizují a zajišťují hladký průběh celé akce.

Do dalšího desetiletí nám všem přeji nepolevující nadšení, hodně mladých nadějných vědců i další nárůst povědomí o akci na Slovensku. A zároveň příznávám, že bych ráda uskutečnila myšlenku, kterou v jednom ze svých úvodů k této konferenci vyrazil Pavel Drašar, aby se podařilo zorganizovat mezinárodní finále, alespoň na úrovni středoevropského regionu.

Desátému ročníku „Ameriky“ zdar !

Daniela Dornerová  
Sigma-Aldrich Praha

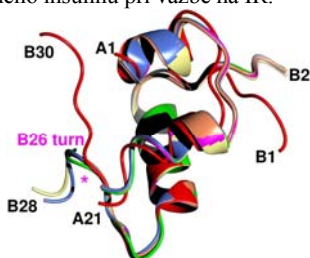
## STRUKTURY VYSOCE AKTIVNÍCH ANALOGŮ INSULINU NAZNAČUJÍ AKTIVNÍ FORMU HORMONU

EMÍLIA ANTOLÍKOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ JIRÁČEK<sup>a\*</sup>, LENKA ŽÁKOVÁ<sup>a</sup>, CHRISTOPHER J. WATSON<sup>a</sup>, JOHAN P. TURKENBURG<sup>b</sup>, GUY G. DODSON<sup>b</sup> a MAREK A. BRZOZOWSKI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>ÚOCHB AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika, <sup>b</sup>Department of Chemistry, The University of York, Heslington, York, YO10 5YW, United Kingdom

Insulin je klíčový hormon, který reguluje hladinu krevní glukosy a má široký účinek v metabolismu proteinů a lipidů. Působení insulinu je zprostředkováno vazbou jeho monomeru na specifický receptor (IR). Navzdory dlouholetému úsilí není struktura IR v komplexu s insulinem známa a informace o struktuře insulinu jsou založeny pouze na neaktivních zásobních a multimerních formách hormonu. Předpokládá se, že molekula insulinu podléhá během vazby na IR konformačním změnám. Odklonem aminokyselin v pozicích B25-B30 od centrální části molekuly insulinu by mělo dojít k zpřístupnění aminokyselin A1-A3, které jsou důležitou součástí vazebného místa pro IR.

V této studii jsme se pokusili definovat strukturní znaky aktivní formy insulinu. Připravili jsme sérii analogů insulinu s modifikacemi v poloze B26 a určili jsme jejich vazebné afinity vůči IR a jejich krystalové struktury. Neaktivnější analog [NMeAlaB26]-DTI-NH<sub>2</sub> (465%) byl krystalizován jako monomer s novou konformací v pozicích B24-B26, která se vyznačuje β-ohybem typu II (B26-ohyb). Totožný či podobný B26-ohyb byl identifikován i dalších analogů s *N*-methylovanou či *D*-aminokyselinou v poloze B26. Důsledkem přítomnosti B26-ohybu v molekule insulinu je odklon aminokyselin B25-B26(B30) od centrální α-šroubovice a *N*-konce A-řetězce insulinu. Tím dochází k odhalení předtím skrytých aminokyselin A1-A3 (obr. 1). Konvergence struktur vysoce aktivních analogů insulinu naznačuje, že pozorovaný B26-ohyb by mohl být velmi podobný struktuře, která charakterizuje aktivní formu přirozeného insulinu při vazbě na IR.



Obrázek 1. Superpozice hlavního řetězce lidského insulinu (červeně) a několika analogů s *N*-methylací v pozici B26.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR LC06077, GA AVČR KJB400550702 a AVČR Z40550506.

### LITERATURA

- Jiráček J., Žáková L., Antolíková E., Watson C. J., Turkenburg J. P., Dodson G. G., Brzozowski A. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v tisku.

## EVALUÁCIA FLUORIMETRICKÉHO TESTU NA DETEKCIU CYTOTOXICKÉHO EFEKTU GÉNOVEJ TERAPIE SPROSTREDKOVANEJ MEZENCHÝMOVÝMI KMEŇOVÝMI BUNKAMI *IN VITRO*

LENKA BARANOVIČOVÁ<sup>a</sup> a MIROSLAVA MATUŠKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Katedra mikrobiológie a virológie, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava; <sup>b</sup>Ústav experimentálnej onkológie SAV, Laboratórium molekulárnej onkológie, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, SR  
Lenka.Baranovic@gmail.com

Mezenchýmové kmeňové bunky (mesenchymal stem cells; MSC) sú heterogénna populácia nediferencovaných multipotentných buniek s unikátnymi vlastnosťami. Ich schopnosť seba-obnovy a opravy poškodení je jedinečná. Dokážu rozpoznať chemické signály vysielané poškodeniami v organizme (trauma, fraktúra, nekróza, zápal, nádory...), krvnou cestou doputovať do takéhoto miesta, usídlit' sa, vplyvom rastových faktorov rýchlo proliferovať a diferencovať na príslušný typ tkaniva. Poškodenie tak zregenerujú bez jaziev či zrastov<sup>1</sup>.

Podľa špeciálnej komisie, ktorá sa zaoberá MSC (The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy) musia tieto bunky spĺňať isté kritériá, aby získali status „MSC“. Po prvé musia byť schopné adherovať na plast za normálnych kultivačných podmienok. Po druhé musia exprimovať povrchové CD markery: CD105, CD73, CD90 a naopak nesmú exprimovať: CD45, CD31, CD14, CD11b, CD79α, CD19 a HLA II. triedy. Posledným kritériom je diferenciácia do troch bunkových typov – adipocytov, osteoblastov a chondroblastov za špecifických kultivačných podmienok<sup>2</sup>.

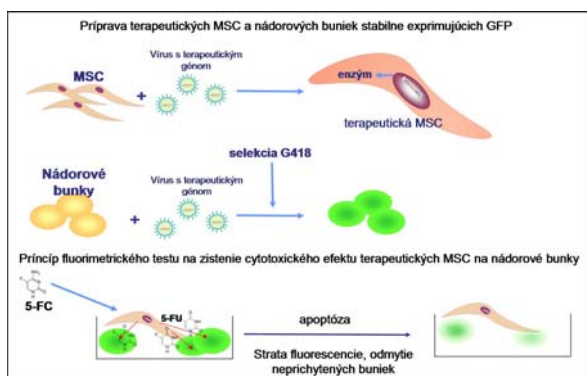
MSC sa vyskytujú v rôznych typoch tkanív derivovaných z mezenchýmu. Ich prítomnosť bola dokázaná v kostnej dreni, pupečníkovej krvi, v spojivových tkanivách, svaloch či v srdci. V Laboratóriu molekulárnej onkológie ÚEO SAV využívame MSC derivované z tukového tkaniva - AT-MSC (adipose tissue-derived MSC). Tukové tkanivo je získavané ako odpadový materiál po liposukcii. Jednoduchým postupom sa dajú z neho izolovať mezenchýmové kmeňové bunky.

Na základe poznatku, že MSC sú schopné vyhľadávať poškodenia a pomocou veľmi podobných signálov aj nádory, sa z nich stal atraktívny nástroj pre génovú terapiu, kde sa využívajú ako vektory. Geneticky modifikované AT-MSC obsahujú terapeutické gény, ktorých exprimovaním vznikajú enzýmy, konvertujúce netoxické predliečivá na toxické metabolity bezprostredne v blízkosti nádoru. Takýmto spôsobom by sa eliminovali nežiaduce účinky bežne používaných chemoterapeutík.

Využívame dva systémy MSC-sprostredkovanej génovej terapie - HSV-tk/GCV a CD/5-FC. Prvým terapeutickým génom je tymidínkináza (HSV-tk) derivovaná z vírusu *Herpes simplex*, ktorá fosforyluje netoxický ganciklovir (GCV) na ganciklovir-monofosfát. Ten je konvertovaný endogénnymi kinázami na veľmi toxický

ganciklovir-trifosfát. Exprimovaním druhého génu vzniká enzým cytozín-deamináza (CD), konvertujúca netoxický 5-fluorocytosín (5-FC) na vysoko toxický 5-fluorouracyl (5-FU).

V MSC-sprostredkovej terapii sme kokultivovali nádorové bunky stabilne exprimujúce zelený fluorescenčný proteín (green fluorescent protein; GFP) s AT-MSK nesúcimi jeden z terapeutických génov – TK alebo CD. Sledovali sme cytotoxický efekt HSV-tk/CD-MSK na nádorové bunkové línie a určili efektívnosť jednotlivých terapeutických systémov podľa tzv. fluorimetrického testu. Po 24 hodinách vzájomnej kultivácie oboch typov buniek sme pridali rôzne koncentrácie predliečiva – GCV/5-FC a následne po 48 h zmerali úbytok intenzity fluorescence pomocou fluorimetra POLARstar OPTIMA. Čím bola nižšia intenzita fluorescence, tým bolo viac uhynutých nádorových buniek a terapia sa javila ako účinnejšia. Následne sme porovnali efektívnosť eliminácie jednotlivých nádorových bunkových línií.



Obr. 1. Príprava terapeutických/GFP<sup>+</sup> buniek a princíp fluorimetrického testu pomocou CD/5-FC terapie

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0146/10 a APVV 0260-07.

#### LITERATÚRA

1. Delorme B., Chateauvieux S., Charbord P.: Regen Med. 1, 497 (2006).
2. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.: Cytotherapy 9, 301 (2007).

#### CHARAKTERISTIKA LIDSKÝCH GRANULÓZOVÝCH BUNĚK ZÍSKANÝCH PŘI *IN VITRO* FERTILIZACI

**LENKA BRŮČKOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ SOUKUP, JIŘÍ MOOS, MARTINA MOOSOVÁ, JANA PAVELKOVÁ, KAREL ŘEŽÁBEK, BENJAMÍN VÍŠEK a JAROSLAV MOKRÝ**

*Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové  
bruckova@gmail.com*

Cílem naší práce bylo stanovení fenotypu a základních biologických charakteristik populace granulózových buněk (GCs, granulosa cells) získaných z folikulů lidských ovárií. GCs byly získány od 41 hormonálně stimulovaných žen podstupujících *in vitro* fertilizaci. Buňky byly transportovány při 37 °C ve folikulární tekutině, kultivovány v médiu DMEM/F12 obohaceném o růstové faktory (EGF, bFGF), folikuly stimulující hormon a 2% fetálního telecího séra. V průběhu experimentu jsme pozorovali významný vliv folikulární tekutiny na proliferaci buněk v prvním týdnu kultivace, umožňující získat velké množství buněk s vysokým proliferacním potenciálem.

Analýza ukázala, že GCs kultivované dlouhodobě *in vitro* potřebují pro prvních 20 populačních zdvojení 68–101 hodin. Viabilita kultivovaných buněk v proliferacní fázi se výrazně neměnila (92% ± 5). DNA analýza prokázala 46,7–61,6 % buněk v SG<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu. Analýza fenotypu pomocí průtokové cytometrie prokázala vysokou pozitivitu pro znaky CD29, CD44, CD73, CD90, CD166, nízkou pozitivitu pro HLA-1 a negativitu pro znaky CD34, CD45, CD49e, CD71, CD105, CD146, CD222.

Sledovali jsme počet populačních zdvojení a čas potřebný na zdvojení celé populace buněk. Podařilo se nám vykultivovat línie GCs, která měla 3x vyšší počet populačních zdvojení. Byla také stanovena délka telomer, která klesala v závislosti na počtu dní *in vitro* kultivace. Pro vyloučení nádorové transformace buněk při kultivaci, byl u všech línií stanoven karyotyp. Jednotlivé línie byly navzájem porovnány a srovnány se stabilizovanou línií COV434 pocházející z granulózového nádoru. Podle našeho protokolu je možné dlouhodobě kultivovat GCs, které mohou poskytnout výborný model pro pochopení fyziologických dějů při folikulogenezi a studium patologických změn v lidském ováriu.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů ČR č. MSMT 0021620820, MSMT 0021627502 a IGA MZ č. NS/9781-3.

#### MONITOROVÁNÍ FOSFORYLACE CRKL A SRC KINÁZ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ LÉČENÝCH INHIBITORY TYROZINKINÁZ

**LENKA CALÁBKOVÁ<sup>a</sup>, RENÁTA MOJŽÍKOVÁ<sup>a</sup>, EDGAR FABER<sup>b</sup> a VLADIMÍR DIVOKÝ<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc; <sup>b</sup>Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc  
lenka.calabkova@upol.cz*

Chronická myeloidní leukémie (CML) je onemocnění, které je asociováno se vznikem tzv. Filadelfského chromosomu (Ph) vlivem reciproké chromosomové translokace t(9;22)(q34;q11). Na genové úrovni takto vzniká nový fúzní gen *BCR-ABL* kódující konstitutivně aktivní Bcr-

Abl tyrozinovou kinasu (TK), která je nezbytná a dostačující pro nádorovou transformaci buňky<sup>1</sup>. Specifické inhibitory tyrozinokinas (TKI) představují v současnosti první volbu při léčbě pacientů s CML.

V naší laboratoři jsme vyvinuli funkční *in vitro* test, který nám umožňuje sledovat míru účinnosti TKI v inhibici Bcr-Abl TK. Metodika je založena na inkubaci izolovaných leukocytů v přítomnosti TKI a následné detekci intracelulárních hladin aktivovaných resp. forforylovaných forem cílových molekul Bcr-Abl TK, především proteinu Crkl (specifický substrát Bcr-Abl TK) a kinas rodiny Src (SFK). Aktivace SFK je asociována s progresí onemocnění a rezistencí na léčbu. Pro zvýšení validity výsledku jsme od původního hodnocení rezistence/citlivosti pomocí imunoblotu<sup>2</sup> přešli na průtokovou cytometrii s imunodetekcí, která ve srovnání s imunoblotem nabízí jak kvalitativní, tak kvantitativní zhodnocení a je navíc laboratorně a co do spotřeby vzorku méně náročná.

Pomocí *in vitro* funkčního testu sensitivity leukocytů na TKI, který koreluje s průběhem onemocnění<sup>3</sup>, lze velmi účinně nejen predikovat odpověď nemocného na léčbu těmito TKI, ale zejména včasným odhalením nastupující rezistence na léčbu přispět k rozhodování o léčbě s cílem dosáhnout a udržet optimální léčebnou odpověď a zabránit progresi onemocnění<sup>4,5</sup>.

*Podpořeno granty NS9949-2, MSM6198959205 a společností Bristol-Myers Squibb.*

#### LITERATURA

1. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V.: *Blood* 96, 3343 (2000).
2. Naušová J., Priwitzerová M., Jarošová M., Indrák K., Faber E., Divoký V.: *Čas. Lék. Česk.* 145, 377 (2006).
3. Solna R, Veselovska J, Rozmanova S, Faber E, Jarosova M, Holzerova M, Indrak K, Divoky V.: *Hematol J.* 93, a0558 (2008).
4. Veselovska J, Solna R, Jarosova M, Faber E, Urbankova H, Holzerova M, Balcarkova J, Indrak K, Divoky V.: *Blood* 112, a1624 (2008).
5. Faber E, Mojzíkova R, Plachy R, Rozmanova S., Stastny M., Divoka M., Jarosova M., Indrak K., Divoky V.: *Leuk. Res.* 34, e91 (2009).

#### IDENTIFIKACE NOVÝCH VAZEBNÝCH PARTNERŮ PRO ONKOPROTEIN MDM2 A JEJICH VLIV NA REGULACI MDM2 A P53 V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

**KATEŘINA CETKOVSKÁ<sup>a</sup>, KAREN H. VOUSDEN<sup>b</sup> a STJEPAN ULDRIJAN<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Universita, Kamenice 5, 62500 Brno;* <sup>b</sup> *Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow G61 1BD, UK*  
uldrijan@med.muni.cz

Protein p53 je významným nádorovým supresorem a jeho funkce je nějakým způsobem narušena u většiny nádorů,

zejména mutacemi v genu pro p53. Nicméně u nemalé části nádorů, které mají gen pro p53 neporušený, je funkce proteinu vyřazena kvůli nadměrné expresi jeho negativního regulátoru, onkoproteinu Mdm2<sup>1</sup>. Mdm2 slouží jako E3 ubikvitin ligasa a předurčuje p53 a své ostatní substráty, včetně sebe sama, k degradaci v proteasomu 26S.

Mechanismy regulující aktivitu proteinu Mdm2 v nádorových buňkách nejsou zatím zcela jasné. Za účelem identifikace nových interakčních partnerů a potenciálních regulátorů proteinu Mdm2 jsme provedli tandemovou afinitní purifikaci buněčných komplexů obsahujících centrální část proteinu Mdm2 z několika lidských buněčných linií. Tyto proteinové komplexy pak byly dále analyzovány hmotnostní spektrometrií.

Identifikovali jsme dva nové potenciální regulátory Mdm2 – bazální transkripční faktor GTF2I a protein USP48, který patří do rodiny ubikvitin-terminálních karboxyl-hydrolas a jehož funkce zatím není známa. Interakci těchto proteinů s Mdm2 jsme potvrdili pomocí imunoprecipitace a imunofluorescenčních relokalizačních experimentů.

Z ubikvitylačních experimentů vyplývá, že protein GTF2I silně zvyšuje hladinu ubikvitylace p53 a mohl by tak být negativním regulátorem p53. GTF2I se mimo jiné podílí na aktivaci transkripce cílových genů při narušení funkce endoplazmatického retikula (ER)<sup>2</sup>. Pomocí luciferázového reportérového konstruktů se nám podařilo zjistit, že Mdm2 snižuje transkripční aktivitu GTF2I, což naznačuje, že protein Mdm2 může zasáhnout do buněčné odpovědi na poruchu funkce ER.

Přítomnost USP-domény u dalšího identifikovaného interakčního partnera USP48 naznačuje, že tento protein bude sloužit jako deubikvitylační enzym a stabilizovat tak již ubikvitylované substráty<sup>3</sup>. Naše výsledky ukazují, že USP48 opravdu stabilizuje Mdm2. V přítomnosti USP48 je však autoubikvitylace Mdm2 zesílena, což ukazuje, že USP48 reguluje stabilitu Mdm2 jiným, složitějším mechanismem, než jeho deubikvitylací.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 301/09/1324.*

#### LITERATURA

1. Soussi T., Bérout C.: *Nat. Rev. Cancer* 1, 233 (2001).
2. Hong M., Lin M.Y., Huang J.M., Baumeister P., Hakre S., Roy A.L., Lee A.S.: *J. Biol. Chem.* 280, 16821 (2005).
3. Tzimas C., Michailidou G., Arsenakis M., Kieff E., Mosialos G., Hatzivassiliou E.G.: *Cell Signal.* 18, 83 (2006).

#### VANADOCENOVÉ KOMPLEXY SEKUNDÁRNÍCH AMINOKYSELIN: MODELOVÉ SYSTÉMY PRO STUDIUM MECHANISMU ÚČINKU METALLOCENOVÝCH CYTOSTATIK

**TEREZA DĚDOURKOVÁ, JAROMÍR VINKLÁREK a JAN HONZÍČEK**

*Katedra obecné a anorganické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*  
terca.d@post.cz

Interakce vanadocendichloridu a 1,1'-dimethylvanadocendichloridu s aminokyselinami obsahujícími sekundární aminoskupinu poskytuje tři strukturální typy komplexů (Schéma 1), kde dochází ke koordinaci:

A) jedné molekuly aminokyseliny pomocí atomu dusíku aminoskupiny a atomu kyslíku karboxylové skupiny chelátovým typem vazby,

B) dvou molekul aminokyselin prostřednictvím atomů kyslíku jejich karboxylových skupin monodentátním typem vazby,

C) jedné molekuly aminokyseliny přes oba atomy kyslíku karboxylové skupiny chelátovým typem vazby.

V komplexech s L-prolinem a N-methylglycinem byly nalezeny typy vazeb A) a B), zatímco N-fenylglycin tvořil s vanadocenovým fragmentem pouze komplex typu C).

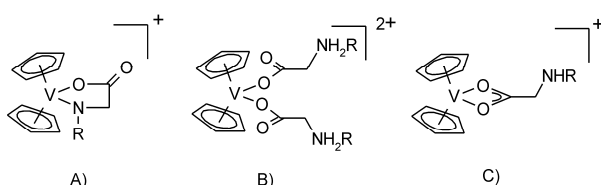


Schéma 1

Bylo izolováno 11 nových vanadocenových komplexů, které byly charakterizovány pomocí vhodných analytických a spektroskopických metod. V případě sedmi komplexů, které zahrnovaly všechny tři strukturální typy, byly připraveny monokrystaly vhodné pro rentgenostrukturální analýzu.

Připravené komplexy jednoznačně potvrdily možnost vazebné interakce metalocenového fragmentu se sekundárními aminokyselinami jako vhodného modelového systému pro možnou interakci s peptidy. Výsledky této práce podporují předpokládaný mechanismus účinku cytostaticky aktivních metalocenů inhibicí DNA procesních enzymů (proteinkinasa C a topoizomerasa II)<sup>1</sup>, nebo transportních bílkovin (transferin)<sup>2,3</sup>.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 203/09/0460.

#### LITERATURA

1. Kuo L. Y., Liu A. H., Marks T. J., v knize: *Metal Ions in Biological Systems*, kap. 33, s. 85. Marcel Dekker, New York 1996.
2. Nishida Y., Niinuma A., Abe K.: *Inorg. Chem. Commun.* 12, 198 (2009).
3. Du H., Xiang J., Zhang Y., Tang Y., Xu G.: *J. Inorg. Biochem.* 102, 146 (2008).

#### FUNKČNÍ ANALÝZA RING DOMÉN ONKOPROTEINŮ MDM2 A MDMX

**PAVLÍNA DOLEŽELOVÁ, KATEŘINA CETKOVSKÁ a STJEPAN ULDRIJAN**

*Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
pdolezel@med.muni.cz*

Protein p53 je transkripční faktor vyznačující se schopností působit proti nádorové transformaci buněk a hraje klíčovou roli v regulaci buněčné odpovědi na stresové podněty, např. poškození DNA. Za normálních podmínek je hladina aktivního p53 v buňkách udržována na nízké úrovni především díky přítomnosti onkoproteinů Mdm2 a MdmX (cit.<sup>1</sup>).

Zatímco Mdm2, jako E3 ubikvitin ligasa, indukuje degradaci p53 prostřednictvím 26S proteasomu, MdmX i přes svou značnou strukturální podobnost s Mdm2 postrádá ubikvitin ligázovou aktivitu. MdmX sám o sobě pouze účinně inhibuje transkripční aktivitu p53, avšak ve formě dimeru s Mdm2 se dokáže aktivně podílet<sup>1</sup> i na degradaci p53. Právě tvorba heterodimerů Mdm2-MdmX prostřednictvím RING domén vede ke stimulaci E3 ubikvitin ligasové aktivity Mdm2 (cit.<sup>2</sup>).

Pro objasnění strukturálních a funkčních rozdílů RING domén Mdm2 a MdmX jsme vytvořili sérii bodových mutantů Mdm2, u nichž byla vždy nahrazena krátká část RING domény Mdm2 odpovídající sekvenci MdmX. Pomocí relokalizačního testu a imunoprecipitace jsme ověřili jejich schopnost interagovat s RING doménou MdmX. Naše výsledky naznačují, že aminokyselina cystein v pozici 449 je nezbytná pro fyzickou interakci RING domény Mdm2 s MdmX. Pokud je tato kriticky důležitá aminokyselina vložena do RING domény MdmX, získá tento protein schopnost dimerovat s další molekulou MdmX.

Naše výsledky přispívají k identifikaci rozdílů v primární aminokyselinové sekvenci RING domén Mdm2 a MdmX, které jsou odpovědné za rozdíly ve funkci těchto proteinů a mohou přispět k nalezení mechanismů, jež umožní reaktivaci p53 v některých typech nádorů.

Tato práce vznikla za podpory grantu 301/09/132.

#### LITERATURA:

1. Uldrijan S., Pannekoek W.J., Vousden K.H.: *EMBO J.* 26, 102 (2007).
2. Kakai H., Lolez-Pajares V., Kim M.M., Wiederschain D., Yuan Z.-M.: *Cancer Res.* 67, 6026 (2007).

#### DYNAMIKA TRÁVICÍCH ENZYMŮ KLÍŠTĚTE

*Ixodes ricinus*

**ZDENĚK FRANTA<sup>a</sup>, JITKA KONVIČKOVÁ<sup>a</sup>, HELENA PĚNIČKOVÁ<sup>a</sup>, DANIEL SOJKA<sup>a</sup>, MARTIN HORN<sup>b</sup>, MICHAEL MAREŠ<sup>b</sup> a PETR KOPÁČEK<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup> Parazitologický ústav BC AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, <sup>b</sup> Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemmingovo náměstí 2, 166 10 Praha  
zdeny@paru.cas.cz*

Trávení hostitelské krve, základního zdroje živin a energie, představuje klíčovou událost v biologii klíšťat. Tito ektoparaziti na rozdíl od ostatního krev-sajícího hmyzu tráví hostitelské proteiny intracelulárně v kyselém prostředí trávicích vakuol buněk středního epitelu. Trávení bylo

nejlépe popsáno u klíštěte *Ixodes ricinus* (hlavního přenašeče lymfské boreliózy v Evropě) a je zajišťováno souborem cysteinových a aspartátových peptidas<sup>1,2</sup>. V této práci jsme se zaměřili na studium mRNA, dynamiky a kvantity hlavních trávicích enzymů (cysteinových peptidas katepsinu L, B, C, legumainu a aspartátové peptidasy katepsinu D) ve střevě klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání. Hladina mRNA byla studována pomocí kvantitativní Real Time PCR. Aktivita a molární koncentrace jednotlivých enzymů ve střevě klíštěte byly určovány pomocí specifických fluorescenčních substrátů a titrací aktivního místa specifickými inhibitory. Afinitně přečištěné polyklonální protilátky (připravené proti jednotlivým rekombinantním enzymům) byly využity k detekci cysteinových proteas (IrCB, IrCL a IrCC) uvnitř střevních buněk imunofluorescenční mikroskopií a k „western blot“ analýze těchto enzymů ve střevě klíštěte. Všechna takto získaná data ukazují, že k největším změnám dochází ke konci periody pomalého sání (4-6 dnů po přichycení na hostitele). Ta předchází prudkému příjmu hostitelské krve, kdy oplodněná samice nasaje až 70 % celkového objemu krve během 2 dnů. Důkladný expresní profil společně s biochemickou charakterizací jednotlivých peptidas otevírá nové možnosti v boji s klíšťaty a jimi přenášenými patogeny.

*Tato práce vznikla za podpory grantu IAA600960910 (GA AVČR), KJB600960911 (GA AVČR) a Výzkumného centra LC06009 (MŠMT ČR).*

#### LITERATURA

1. Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdušek O., Caffrey C.R., Mareš M., Kopáček P.: *Parasit. Vectors* 1, 7 (2008).
2. Horn M., Nussbaumerová M., Šanda M., Kovářová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C.R., Kopáček P., Mareš M.: *Chem. Biol.* 16, 1053 (2009).

#### TOTÁLNÍ SYNTÉZA FERROCENESTRONU

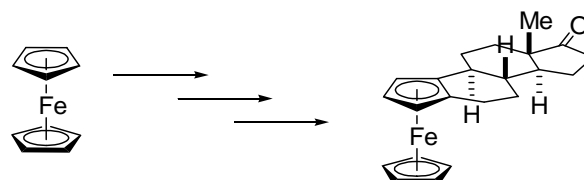
##### FILIP HESSLER<sup>a</sup> a MARTIN KOTORA<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6  
fhessler@c-box.cz; kotora@natur.cuni.cz

V posledních několika letech je věnována zvýšená pozornost novým sloučeninám ferrocenu s biologicky aktivními molekulami, a to pro své zajímavé vlastnosti<sup>1,2</sup>. Příkladem takové látky může být ferrocifen, derivát antiestrogenu tamoxifenu. Nyní jsou testovány jeho účinky proti karcinomu prsu.

I když je známo několik konjugátů ferrocenu a steroidů, zatím ještě nebyla připravena sloučenina obsahující ferrocen přímo v steroidním skeletu. Na základě předchozích zkušeností z nedávné syntézy estronu<sup>3</sup>, jsme se rozhodli připravit první steroid s integrovaným ferrocenovým jádrem – ferrocenestron.

Syntéza vycházela z vhodně substituovaného chirálního ferrocenu s jeho následnými transformacemi pomocí reakcí katalyzovaných přechodnými kovy. Mezi tyto postupy patřily například oxidativní adice s navazující alkyací zprostředkovaná zirkonocenem, cross-coupling katalyzovaný komplexem palladia, enynová metathese katalyzovaná karbenovou sloučeninou ruthenia, a nakonec hydrogenace dvojných vazeb za použití heterogenních (Pd/C) či homogenních katalyzátorů (komplex Ir).



*Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857 a IM0508 (Center for New Antivirals and Antineoplastics).*

#### LITERATURA

1. Van Staveren D. R., Metzler-Nolte N.: *Chem. Rev.* 104, 5931 (2004).
2. Schatzschneider U., Metzler-Nolte N.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 1504 (2006).
3. Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).

#### ANTIFLOGISTICKÉ VLASTNOSTI NOVĚ IZOLOVANÉ LÁTKY MA-13 Z *Morus alba*

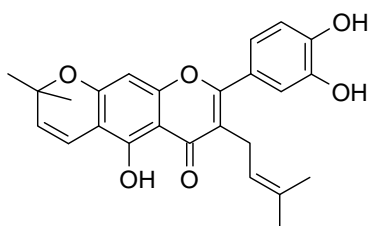
##### JAN HOŠEK, KAREL ŠMEJKAL, VERONIKA ŽÁVALOVÁ, PETER KOLLÁR a MILAN BARTOŠ

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Palackého 1-3, 612 42 Brno  
hosekj@vfu.cz

Moruše bílá (*Morus alba* L., *Moraceae*) je v tradiční čínské medicíně využívána při léčbě některých zánětlivých stavů. Zánět je součástí přirozené obrany těla, ale vyšší míra zánětu může tělo poškodit. Je také známa celá řada chronických zánětlivých onemocnění, která vyžadují dlouhodobou léčbu, proto představuje vývoj nových antiflogistik důležitý směr v rozvoji farmakoterapie.

Na základě screeningu látek izolovaných z *Morus alba* byla vybrána sloučenina MA-13 (schéma 1), která prokazovala největší schopnost tlumit expresi pro-zánětlivého cytokinu TNF $\alpha$  *in vitro* na linii lidských makrofágů THP-1 stimulovaných bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). Proti-zánětlivá aktivita látky MA-13 byla dále podrobně studována na úrovni změny transkripce pro-zánětlivého cytokinu CCL2, pro-zánětlivých enzymů NOS2 a COX2 a proti-zánětlivého proteinu ZFP36. Expresie cytokinu TNF $\alpha$  byla taktéž sledována na úrovni translace. Většina genů těchto proteinů je pod transkripční kontrolou NF- $\kappa$ B, proto byla změněna i schopnost látky MA-13 potlačovat translokaci tohoto transkripčního faktoru z cytoplasmy do jádra.





Struktura molekuly látky MA-13

Získané údaje prokazují schopnost látky MA-13 významně snižovat transkripci pro-zánětlivého cytokinu TNF $\alpha$ . Signifikantní úbytek TNF $\alpha$  byl také zaznamenán na úrovni translace, kdy MA-13 10 $\times$  snížila celkové množství tohoto cytokinu v mediu u LPS-stimulovaných makrofágů. Transkripce dalšího pro-zánětlivého cytokinu – CCL2 – byla taktéž snížena, ale bez statistické průkaznosti. MA-13 měla vliv i na přepis genů pro-zánětlivých enzymů NOS2 a COX2, kdy jejich exprese byla oslabena. U jediného protizánětlivého genu – ZFP36 – byl zaznamenán pouze posun maxima jeho exprese o 2 hodiny. Schopnost MA-13 tlumit expresi pro-zánětlivých genů potvrzuje i skutečnost, že tato látka brzdí vstup NF- $\kappa$ B do jádra, čímž inhibuje jeho funkci jako transkripčního faktoru. Ve všech sledovaných parametrech je MA-13 účinnější než indometacin, který je běžně užívaným antiflogistikem a který byl použit jako pozitivní kontrola.

Z výsledků této studie vyplývá, že látka MA-13 je nadějnou molekulou pro vývoj nového nesteroidního antiflogistika.

#### PROTEINY *Aspergillus fumigatus* ZAPOJENÉ DO INTERAKCE S HOSTITELEM

**JOSEF HOUSER<sup>a</sup>, JAN KOMÁREK<sup>b</sup>, NIKOLA KOSTLÁNOVÁ<sup>a</sup>, GIANLUCA CIOCI<sup>c</sup>, ANNE IMBERTY<sup>d</sup> a MICHAELA WIMMEROVÁ<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>NCBR a <sup>b</sup>Ústav Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno;

<sup>c</sup>ESRF, 6 rue Jules Horowitz, 38043 Grenoble, France;

<sup>d</sup>CERMAV-CNRS, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France  
houser@mail.muni.cz

Dlouho známá saprofytická houba – plíseň *Aspergillus fumigatus* (Kropidlák zakouřený) je nejen všudypřítomným alergenem, ale, jak se stále častěji ukazuje, také významným patogenem u pacientů s oslabenou imunitou. Tzv. invazivní aspergilóza zasahuje zejména plic, ale jsou známy případy invaze do ledvin, srdce či mozku. Vzhledem k tomu, že na mnohé kmeny běžná fungicidní léčba zabírá jen nedostatečně, dosahuje úmrtnost zasažených osob i desítek procent. Důkladné poznání mechanismů, které zprostředkovávají interakci patogen-hostitel a umožňují tak rozvoj infekce, by mělo vést k nalezení odlišných způsobů léčby.

U mnoha patogenních mikroorganismů slouží k vazbě na epiteliální povrchy hostitele proteiny ze skupiny lektinů. Prohledáním nedávno sekvenovaného genomu *Aspergillus*

*fumigatus* kmene Af293 byla nalezena necelá desítka genů kódujících potenciální lektiny. Několik z těchto genů bylo klonováno do plazmidových vektorů za účelem přípravy rekombinantních proteinů. Dosavadní výsledky nejen potvrzují širokou strukturní variabilitu lektinů v rámci zkoumaného druhu, ale rovněž vyzdvihují odlišnosti těchto molekul od homologických proteinů dosud zkoumaných u jiných organismů.

Připravené proteiny jsou zkoumány jak z hlediska strukturního, tak funkčního. Dosud bylo řešeno několik struktur, které byly získány metodou rentgenové difrakce. Z funkčního hlediska je zjišťována jak specifita interakce (SPR – měření rezonance povrchového plazmonu, glycanarray – širokospektrální test vazby cukerných struktur), tak termodynamické parametry pro biologicky významné ligandy (zejména techniky založené na mikrokolorimetrii). Kombinací získaných dat pak vytváříme komplexní pohled na tyto proteiny – možné faktory virulence.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR (MSM0021622413, LC6030, ME08008) a GA ČR (GA/303/09/1168, GD301/09/H004).

#### PROGRESIVNÍ MIKROSKOPICKÉ METODY V BIOMEDICÍNĚ

**PAVEL HOZÁK**

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha  
hozak@img.cas.cz

Mikroskopie v současnosti zasahuje nebyvalou měrou do výzkumu v biomedicíně, neboť moderní postupy umožnily pozorovat změny v živých buňkách a tkáních a dokonce i elektronová mikroskopie již zvládá zobrazení biomolekul v nativní hydratované podobě. V přednášce budou diskutovány mikroskopické přístupy, které v posledních letech nejvíce rozšiřují naše poznání. Ze světelně-mikroskopických metod bude pojednáno o technikách *in vivo* zobrazení a detekce interakcí mezi molekulami (FRAP, FRET, FCS). Z elektronové mikroskopie bude diskutována ultrastrukturální tomografie, kryomikroskopické metody a pokročilé metody ultrastrukturálního imunoznačení včetně speciálních šetrných postupů pro přípravu elektronmikroskopických vzorků (vysokotlaké zamrazování, kryosubstituce). Postupy budou dokumentovány na příkladu zkoumání vůbec prvního identifikovaného molekulárního motoru v buněčném jádře - myosinu 1C. Diskutovány budou perspektivy zobrazovacích metod v blízké budoucnosti.



**HOTSPOT WIZARD: NÁSTROJ PRO INŽENÝRSTVÍ ENZYMŮ****EVA CHOVANCOVÁ, ANTONÍN PAVELKA a JIŘÍ DAMBORSKÝ**

*Loschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
akllupe@chemi.muni.cz*

Proteinové inženýrství se zabývá modifikací struktury proteinů s cílem lépe porozumět mechanismům jejich fungování a vylepšit jejich vlastnosti pro průmyslové aplikace. Jedním z klíčových kroků celého procesu je výběr aminokyselin, jejichž modifikace povede k požadovaným změnám proteinu. Racionální návrh mutací vyžaduje detailní znalost struktury a funkce proteinu a nemalé zkušenosti v této oblasti.

HotSpot Wizard<sup>1</sup> je webový server pro automatickou identifikaci pozic vhodných pro inženýrství aktivity, substrátové specifity a enantioselektivity enzymů. Pro tento účel integruje informace získané z několika bioinformatických databází a nástrojů, čímž umožňuje i běžnému uživateli jednoduše provést poměrně komplexní analýzu strukturně-funkčních vztahů cílového enzymu.

HotSpot Wizard je volně přístupný přes webové rozhraní <http://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard>. Jediným povinným vstupem aplikace je 3D struktura enzymu. Během procesu výpočtu jsou nejprve získány anotace týkající se katalytických a jiných, pro funkci enzymu nepostradatelných, aminokyselin. Mutageneze těchto aminokyselin není doporučena. Následně jsou identifikovány aminokyseliny tvořící kapsu aktivního místa a stěny přístupových tunelů. Tyto aminokyseliny interagují se substráty a produkty reakce a představují tak velmi vhodný cíl pro modifikaci katalytických vlastností enzymu. V závěrečné fázi je na základě výpočtu evoluční konzervovanosti předpokládána bezpečnost mutageneze jednotlivých pozic. Na výstupu jsou jednotlivé aminokyseliny seřazeny podle jejich očekávané vhodnosti pro mutagenezi. Uživatel má pro jednotlivé pozice k dispozici informaci o jejich strukturní lokalizaci, funkčním významu, konzervovanosti a anotaci získané z databází. Výsledky jsou namapovány na strukturu enzymu a mohou být zobrazeny přímo v okně webového prohlížeče.

Na základě experimentálních dat získaných pro více než 6000 mutantů z Protein Mutant Database<sup>2</sup> a z primární literatury bylo potvrzeno, že mutageneze cílcí pozice navržené HotSpot Wizardem poskytuje významně vyšší podíl funkčních mutantů než mutageneze náhodná. Experimentální data taktéž ukazují, že modifikací pozic navržených HotSpot Wizardem lze získat enzymy s novými katalytickými vlastnostmi<sup>1</sup>.

**LITERATURA**

1. Pavelka A., Chovancová E., Damborský J.: *Nucleic Acids Res.* 37, W376 (2009).
2. Kawabata T., Ota M., Nishikawa K.: *Nucleic Acids Res.* 27, 355 (1999).

**FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKA DEFENSINU Z KLÍŠTĚTE *Ixodes ricinus*****TEREZA CHRUDIMSKÁ\*, NATALIA RUDENKO a LIBOR GRUBHOFFER**

*Biologické centrum v.v.i. AV ČR, Parazitologický ústav; Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, PŘF; Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
terezam@paru.cas.cz*

Součástí imunitní odpovědi klíšťat, ale i dalších živočichů, jsou defensiny, malé kationické proteiny (4 kDa). Defensiny byly nalezeny u velkého množství klíšťat<sup>1,2</sup>. U evropského klíštěte *Ixodes ricinus* byly identifikovány dvě isoformy genu pro defensin - def1 a def2 (cit.<sup>3</sup>). Expres obou isoform byla indukována sáním, def1 byl exprimován u všech stádií klíštěte, zatímco def2 jen u dospělců - samic. U nasátých samic byla pozorována výrazná exprese def1 ve střevě, u def2 byla detegována ve všech zkoumaných orgánech. Synteticky připravené def1 a def2 vykazovaly silnou antimikrobiální aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím již při nízkých koncentracích (tabulka I) a to i na multi-rezistentní kmen bakterie *Staphylococcus aureus* (MRSA). Naproti tomu neměly def1 a def2 žádný inhibiční vliv na Gram-negativní bakterie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), kvasinky (*Candida albicans*) a viry (TBEV – virus klíšťové encefalitidy). Syntetický def2 je účinnější než def1. Tento rozdíl je pravděpodobně dán záměnou 1 aminokyseliny v jinak stejné aminokyselinové sekvenci obou isoform, kde def2 má v pozici 8 arginin, zatímco def1 aromatickou aminokyselinu fenylalanin.

Tabulka I, Minimální inhibiční koncentrace (MIC) def1 a def2

Bakterie	MIC def1 [μM]	MIC def2 [μM]
<i>Microrcoccus luteus</i>	0,75	0,4
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	0,75
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	50	25

Def1 ani def2 nemají hemolytické účinky na lidské erythrocyty při výše uvedených koncentracích. Stanovení minimální inhibiční koncentrace, diferenciální exprese a nízká toxicita obou isoform defensinu ukazuje, že defensiny hrají důležitou roli v imunitních pochodech klíštěte *I. ricinus*. Zároveň se dá o těchto klíšťecích proteinech uvažovat jako o potenciálních kandidátech pro vývoj nových antibiotik.

*Tato práce vznikla za podpory grantů: Grantová agentura ČR 524/06/1479 a 206/09/H026; LC06009 a grantového projektu Parazitologického ústavu AVČR Z60220518.*

**LITERATURA**

1. Chrudimská T., Chrudimský T., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L.: *Vet. Parasitol.* 167, 298 (2010).
2. Johns R., Sonenshine D.E., Hynes W.L.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 857 (2001).

3. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.: *Insect Mol. Biol.* 16, 501 (2007).

### FUNKČNÁ ANALÝZA GÉNU *GDX1* KÓDUJÚCEHO HOMOLÓG GENTISÁT 1,2-DIOXYGENÁZY Z KVASINKY *Candida parapsilosis*

**MICHAELA JAKÚBKOVÁ** a **JOZEF NOSEK**

*Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina CH1, 842 15 Bratislava 4 jakubkova@fns.uniba.sk*

Patogénna kvasinka *Candida parapsilosis* je unikátnym modelovým systémom pre štúdium katabolizmu aromatických zlúčenín. Na rozdiel od kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako aj blízko príbuzných druhov rodu *Candida* (napr. *C. albicans*) je *C. parapsilosis* schopná degradovať deriváty fenolu a kyseliny benzoovej dvomi enzymatickými dráhami<sup>3</sup>. Prvou je 3-oxoadipátová a druhou gentisátová dráha. Analýza kompletných sekvencií genómov kvasiniek *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *Lodderomyces elongisporus* odhalila, že väčšina druhov stratila počas evolúcie gény pre komponenty oboch enzymatických dráh<sup>1</sup>. V genóme kvasinky *C. parapsilosis* sme však identifikovali otvorený čítací rámec (ORF) *CPAG03408*. Sekvencia korešpondujúceho proteínového produktu je homologická so sekvenciami gentisát 1,2-dioxygenázy z rôznych druhov organizmov. Tento enzým katalyzuje konverziu gentisátu (2,5-dihydroxybenzoátu) na maleylpyruvát, ktorý je následne sériou reakcií premenený na fumarát a pyruvát<sup>2</sup>. Gén sme nazvali *GDX1* (gentisát dioxygenáza 1).

Hlavným cieľom našej práce je funkčná analýza génu *GDX1*. ORF génu *GDX1* sme klonovali do plazmidového vektora, ktorý umožňuje jeho kontrolovanú expresiu v bunkách kvasiniek. Priebeh enzymatickej reakcie po indukcii exprese génu sme v bunkách transformantov merali pomocou kyslíkovej elektródy. Naše výsledky naznačujú, že počas kultivácie buniek *C. parapsilosis* v médiu s glukózou ako jediným zdrojom uhlíka sú gény gentisátovej dráhy reprimované. Zistili sme, že k ich aktivácii dochádza počas kultivácie buniek v prítomnosti niektorých aromatických zlúčenín. Reguláciu exprese génu *GDX1* sme analyzovali aj prostredníctvom fúzie promotora génu *GDX1* s reportérovým markerom *LAC4*, ktorý kóduje  $\beta$ -galaktozidázu. Vnútro bunkovú lokalizáciu proteínového produktu génu *GDX1* sme stanovili pomocou fúzie so zeleným fluorescenčným proteínom (yEGFP3).

*Táto práca vznikla s podporou grantu z agentúry VEGA (1/0219/08).*

#### LITERATÚRA

1. Butler G., Rasmussen M.D., Lin M.F., Santos M.A.S., Sakthikumar S., et al.: *Nature* 459, 657 (2009).

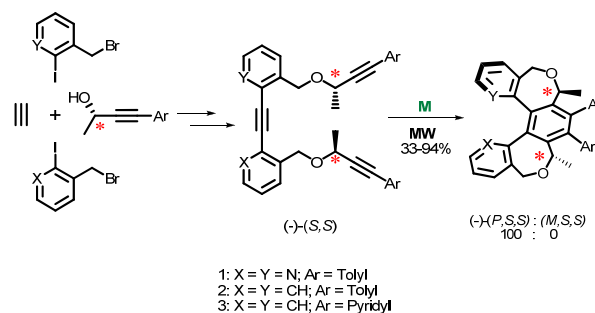
2. Eppink M.H., Cammaart E., Van Wassenaar D., Middelhoven W.J., van Berkel W. J.: *Eur. J. Biochem.* 267, 6832 (2000).
3. Middelhoven W.J., Coenen A., Kraakman B., Sollewijn Gelpke M.D.: *Antonie Van Leeuwenhoek* 62, 181 (1992).

### ASYMETRICKÁ SYNTÉZA AZAHELICENŮ

**ANDREJ JANČAŘÍK**, **IRENA G. STARÁ\*** a **IVO STARÝ\***

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

Heliceny jsou inherentně chirální aromatické látky, které obsahují *ortho*-kondenzovaná benzenová jádra. Ačkoli jsou heliceny známe více jak 50 let, jejich efektivní příprava v opticky čisté formě v multigramovém měřítku dosud nebyla uspokojivě vyřešena. Jedním z možných řešení tohoto problému je diastereoselektivní syntéza opticky čistých látek podobných helicenum, která využívá chirální stavební bloky<sup>1</sup>.



Klíčovým krokem syntézy je intramolekulární [2+2+2] cyklotrimerizace trienů poskytující aromát s helikální chiralitou, která je intenzivně studována naší skupinou<sup>1,2</sup>. Jako nejúčinnější se jeví v případě pentacyklických azahelicenů reakce katalyzovaná kobaltem za současného působení mikrovlnného záření.

*Podporováno GA AV ČR (reg. č. IAA400550916), MŠMT (Centrum pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg. č. LC512) a ÚOCHB AV ČR (tato studie je součástí výzkumného záměru Z4 055 0506).*

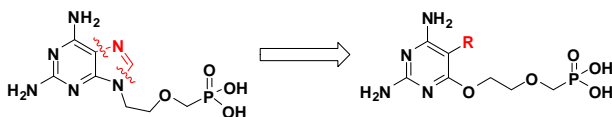
#### LITERATURA

1. Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulišek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, 2074 (2008).
2. Mišek J., Teplý F., Stará I. G., Tichý M., Šaman D., Císařová I., Vojtišek P., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2074 (2008).

**„MAGICKÉ“ PYRIMIDINY MIMIKUJÍCÍ PURINOVÁ ANALOGA S BIOLOGICKOU AKTIVITOU****PĚTR JANSA a ANTONÍN HOLÝ**

Centrum pro nová antivirovika a antineoplastika, Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, v.v.i. Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
 jansa@uochb.cas.cz

Systematickým studiem acyklických nukleosid-fosfonátů<sup>1</sup> (ANP) byla objevena nová skupina látek, která je strukturně odvozena od 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinu<sup>2</sup>. Tyto sloučeniny vykazují vysokou protivirovou aktivitu a mohou být považovány za purinové deriváty s otevřeným imidazolovým kruhem („open-ring“ ANP). Modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu bylo dosaženo zvýšení antivirové aktivity<sup>3</sup>.



Cílem naší práce bylo vyvinout novou efektivní syntetickou cestu pro přípravu těchto 5 substituovaných derivátů ve větším měřítku a připravit následně nové deriváty s potenciální antivirovou aktivitou a případně i jejich proléčiva.

Za tímto účelem byla úspěšně vypracována postupná syntéza acyklické části molekuly opírající se o reakci chlorpyrimidinů s ethylenglykolem<sup>4</sup> a následné zavedení fosfonátového zbytku pomocí tosyoxymethylfosfonátu.

Modifikací polohy 5 pak byly připraveny nové deriváty mimikující původní purinový kruh s vysokou anti-HIV aktivitou, která je o řád vyšší než u příslušného purinového analogu (adefoviru). Dvě látky byly převedeny na lipofilní proléčiva, která následně vykazovala nanomolární aktivity proti VZV.

Teorii obecného mimikování purinových kruhů pomocí vhodně substituovaných pyrimidinů jsme následně úspěšně otestovali při regulaci poruchy metabolismu purinových derivátů *in vitro* a dosáhli jsme lepších účinků než vykazují používané léky. Tento princip tedy může mít ještě další aplikace a „magické“ pyrimidiny se pak mohou stát novým směrem medicínální chemie purinových derivátů.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

**LITERATURA**

1. De Clercq E., Holý A.: Nature Rew. Drug Disc. 4, 928 (2005).
2. Holý A., Votruba I., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., Naesens L., De Clercq E., Balzarini J.: J. Med. Chem. 45, 1918 (2002).
3. Hocková D., Holý A., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., De Clercq E., Balzarini J.: J. Med. Chem. 46, 5064 (2003).
4. Dračínský M., Holý A., Jansa P., Kovačková S., Buděšínský M.: Eur. J. Org. Chem. 2009, 4117.

**ŠTUDIUM APOPTOTICKÝCH BIELKOVÍN ZODPOVEDNÝCH ZA ROZVOJ LIEKOVEJ REZISTENCIE U LEUKEMICKÝCH PACIENTOV****JANA JUREČEKOVÁ, JOZEF HATOK, EVA BABUŠÍKOVÁ, ANDREA ŠTEFÁNIKOVÁ a PETER RAČAY**

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Malá Hora 4, 03601 Martin, Slovensko  
 jurecekova@jfmed.uniba.sk

Hlavným cieľom cytotoxických chemoterapií je indukovať v nádorových bunkách apoptózu. Preto bielkoviny blokujúce apoptózu a látky stimulujúce proapoptotické bielkoviny predstavujú logické ciele pre vývoj nových možností terapie nádorových ochorení. Keďže zvýšená expresia viacerých antiapoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) bola zistená v mnohých typoch nádorov a hematologických malignanciách a je spájaná so zvýšenou rezistenciou na chemoterapiu, značná pozornosť je zameraná práve na tieto bielkoviny. V našej štúdií sme pozorovali vplyv inhibície antiapoptotických bielkovín Bcl-xL a Mcl-1 pomocou siRNA na citlivosť leukemických buniek na spektrum cytostatík. Zistili sme, že transfekcie prostredníctvom Bcl-xL a Mcl-1 siRNA nemali významný vplyv na citlivosť a prežívanie leukemických buniek. V našej práci sme navyše sledovali vplyv nízkomolekulového inhibítora ABT-737, inhibujúceho Bcl-2, Bcl-xL a Bcl-w, na indukciu apoptózy a prežívanie leukemických bunkových línii HL-60 a K-562. Pôsobenie ABT-737 vyvolalo u oboch bunkových línii indukciu apoptózy, pričom fragmentáciu DNA sme mohli pozorovať už po 3 h kultivácie. Citlivejšia na ABT-737 bola bunková línia HL-60 (LC<sub>50</sub> = 5 μM), čo je možné vysvetliť relatívne nižšou expresiou Mcl-1.

Hlbšie štúdium bielkovín podieľajúcich sa na blokovaní apoptózy môže viesť k vytvoreniu nových terapeutických prístupov a tým k zlepšeniu prognózy ochorenia.

**CENTRÁLNA ÚLOHA CDK2 V OSUDOVÝCH ROZHODNUTIACH mEK BUNIEK****ZUZANA KOLEDOVÁ, LEONA RAŠKOVÁ KAFKOVÁ, LENKA CALÁBKOVÁ, VLADIMÍR KRYŠTOF, ALWIN KRÄMER\* a VLADIMÍR DIVOKÝ\***

Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, 775 15 Olomouc  
 zkoledova@gmail.com

Cdk2 kináza riadi prechod z G1 do S fázy bunkového cyklu u somatických buniek. V odpovedi na poškodenie DNA je jej aktivita zablokovaná mechanizmami G1 kontrolného bodu, čím sa bunka zastaví v G1 fáze a zabráni sa replikácii poškodenej DNA. Myšie embryonálne kmeňové (mEK) bunky, ktoré sa od somatických buniek líšia krátkym bunkovým cyklom s jedinečnou štruktúrou, veľmi krátkou

G1 fázou a nefunkčným G1 kontrolným bodom<sup>1</sup>, sú známe veľmi vysokou aktivitou Cdk2<sup>2</sup>. V tejto práci prezentujeme naše výsledky štúdia úlohy Cdk2 v mEK bunkách, ktoré poukazujú na jej centrálnu úlohu v regulácii nielen bunkového cyklu, ale aj sebaobnovy: Špecifická downregulácia aktivity Cdk2 viedla k predĺženiu G1 fázy, nastoleniu bunkového cyklu podobného lokálnemu cyklu somatických buniek, k expresii diferenciálnych markerov a k zmenám morfológie indikujúcim diferenciáciu mEK buniek. Navyše sme zistili, že mEK bunky sa po poškodení DNA v G1 fáze nezastavujú preto, lebo u nich nedochádza k zníženiu aktivity Cdk2, hoci obe dráhy G1 kontrolného bodu (Chk1/2-Cdc25A a 53-p21) sú aktivované. Cdk2 im uniká vďaka špecifickej centrozomálnej lokalizácii. Udržanie vysokej aktivity Cdk2 tak umožňuje zachovanie pluripotencie v podmienkach poškodenia DNA. Naše výsledky naznačujú existenciu priameho prepojenia medzi mechanizmami regulácie sebaobnovy a bunkového cyklu u EK buniek, v ktorom centrálnu úlohu zohráva Cdk2.

Táto práca vznikla za podpory grantov MZ NR/9508 a MŠMT 2B06077 a MSM 6198959205.

#### LITERATÚRA

- White J., Dalton S.: *Stem Cell Rev.* 1, 131 (2005).
- Stead E., White J., Faast R., Conn S., Goldstone S., Rathjen J., Dhingra U., Rathjen P., Walker D., Dalton S.: *Oncogene* 21, 8320 (2002).

### BIOSYNTÉZA TETRAPYRROLŮ U NOVĚ OBJEVENÉ ŘASY *Chromera velia*

**LUDEK KOŘENÝ<sup>a</sup>, ROMAN SOBOTKA<sup>b</sup> a MIROSLAV OBORNÍK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Biologické centrum, Parazitologický ústav AVČR, České Budějovice a <sup>b</sup>Mikrobiologický ústav AVČR, Třeboň  
koreny@paru.cas.cz

Prvoci skupiny Apicomplexa (výtrusovci) jsou intenzivně studováni, jelikož zahrnují významné parazity člověka, mezi něž patří např. původce malárie či toxoplazmózy. Tito parazité se vyvinuli z fotosyntetických řas o čemž svědčí přítomnost redukovaného plastidu, který sice již neplní svou fotosyntetickou funkci, ale stále v něm probíhají důležité procesy a je pro tyto parazity proto nezbytný. Jedním takovým procesem je syntéza hemu, která se tak jeví jako ideální cíl pro antimalarika.

Nedávno byla objevena nová jednobuněčná řasa, *Chromera velia*, která je těmto parazitům blíže příbuzná<sup>1</sup>. Studium biosyntézy tetrapyrrolů u tohoto organismu by tak mohlo pomoci k rozluštění nevyjasněných otázek ohledně syntézy hemu u významných parazitů.

Podařilo se nám z této řasy získat kompletní sekvence téměř všech genů společné dráhy pro syntézu hemu a chlorofylu. Zjistili jsme, že stejně jako výtrusovci a heterotrofní eukaryota syntetizuje i *C. velia* tetrapyrroly z glycinu a succinyl-CoA, což je mezi fotosyntetickými organismy unikátní. Jedná se patrně o jediný organismus, který je

schopen syntetizovat chlorofyl *a* touto cestou. Všechna ostatní fotosyntetická eukaryota a rovněž i sinice totiž vyrábí chlorofyl i hem primárně z glutamátu. To, že je tato řasa schopna metabolizovat glycin na chlorofyl rovněž podpořily výsledky experimentů s radioaktivně značenými prekurzory. Fylogenetické studie jednotlivých genů biosyntetické dráhy ukázaly na společný původ těchto genů u *C. velia* a výtrusovců.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky 206/08/1423.

#### LITERATURA

- Moore R. B., Oborník M., Janouškovec J., Chrudimský T., Vancová M., Green D. H., Wright S. H., Davies N. W., Bolch C. J. S., Heimann K., Šlapeta J., Hoegh-Guldberg O., Logsdon J. M., Carter D. E.: *Nature* 451, 959 (2008).

### MODULACE EXPRESE P-GLYKOPROTEINU TECHNIKOU RNA INTERFERENCE

**PETR KOSZTYU, PETR DOLEŽEL a PETR MLEJNEK<sup>\*</sup>**

Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc  
mlejnek\_petr@volny.cz

Mnohočetná léková rezistence (MDR) je hlavní překážkou k úspěšné chemoterapii u řady nádorových onemocnění. Rezistentní nádorové buňky jsou charakteristické sníženou citlivostí na celé spektrum protinádorových léčiv, které mají různou strukturu a odlišný mechanismus působení. Rezistence buněk je způsobena několika buněčnými mechanismy<sup>1</sup>. Nejlépe charakterizovaným mechanismem, který přispívá k MDR fenotypu, je zvýšená exprese P-glykoproteinu, produktu genu *ABCB1* (*MDR1*)<sup>2,3</sup>. P-glykoprotein je membránový ATP-dependentní transporter pumpující cytotoxickou látku ven z buňky, čímž se snižuje její cytotoxicita. Mnoho prací studujících rezistenci způsobenou P-glykoproteinem využívá buněčné nádorové linie získané z citlivých linií jejich selekcí. K celkové rezistenci nádorových buněk přispívá vedle zvýšené exprese P-glykoproteinu řada odlišných buněčných mechanismů<sup>1</sup>.

K lepšímu pochopení vztahu mezi expresí P-glykoproteinu a rezistencí buněk na protinádorová léčiva jsme využili techniku RNA interference ke specifickému potlačení exprese genu *ABCB1* v buněčné linii K562/R, která se vyznačuje mnohočetnou lékovou rezistencí v důsledku zvýšené exprese P-glykoproteinu. Tato nádorová linie byla transfekována plazmidovým vektorem exprimujícím shRNA zaměřenou proti genu *ABCB1* a byly vyselektovány stabilní subklony. Takto jsme vytvořili buněčné linie K562/R/shABCB1-01-05, které exprimovaly různé množství P-glykoproteinu. Jeho množství se pohybovalo v rozmezí od 10 % až do 75 % nacházející se v linii K562/R. Z výsledků vyplývá, že vztah mezi expresí P-glykoproteinu a rezistencí

nádorových buněk není lineární. Při snižování exprese P-glykoproteinu sice postupně dochází k obnovení citlivosti buněk na protinádorová léčiva, což se ale významně projevilo až při snížení exprese P-glykoproteinu na úroveň 25–30 % v porovnání s rezistentní linií.

*Práce je podpořena grantem MSM 6198959216 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy) a částečně grantem NS/9627 (Ministerstvo zdravotnictví).*

#### LITERATURA

1. Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E.: *Nat. Rev. Cancer* 2, 48 (2002).
2. Juliano R. L., Ling V.: *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152 (1976).
3. Endicott J. A., Ling V.: *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137 (1989).

#### ZVÝŠENÍ STABILITY ENZYMU INŽENÝRSTVÍM PŘÍSTUPOVÝCH TUNELŮ

**TÁŇA KOUDELÁKOVÁ<sup>a</sup>, RADKA CHALOUPKOVÁ<sup>a</sup>, MARTINA PAVLOVÁ<sup>a</sup>, CHRISTIAN ZIMMER<sup>b</sup>, UWE T. BORNSCHEUER<sup>b</sup> a JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Loschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno,*

<sup>b</sup>*Abteilung Biotechnologie und Enzymkatalyse, Universität Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, D-17487 Greifswald [tangerine@chemi.muni.cz](mailto:tangerine@chemi.muni.cz)*

Halogenalkandehalogenázy (EC 3.8.1.5), katalyzující hydrolyzu širokého spektra chlorovaných, bromovaných a jodovaných uhlovodíků, náleží k enzymové nadrodině  $\alpha/\beta$ -hydrolas. Tyto robustní bakteriální enzymy mají vysoký aplikační potenciál, neboť přeměna často toxických halogenovaných sloučenin nalézá využití při biodegradacích, bioremediacích i dekontaminacích. Některé specifické aplikace vyžadují použití enzymů tolerantních k přítomnosti organického rozpouštědla či stabilních při vyšší teplotě. V této studii jsme se zaměřili na vylepšení stability halogenalkandehalogenasy DhaA, z bakteriálního kmene *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (cit.<sup>1</sup>), v přítomnosti organického rozpouštědla.

Mutatní knihovna rekombinantního genu kódujícího tento enzym byla zkonstruována jeho náhodnou mutagenézou pomocí chybující *Taq* polymerasy. Sedm tisíc kolonií mutantní knihovny bylo otestováno na aktivitu v pufru obsahujícím dimethyl sulfoxid pomocí modifikované aktivní eseje využívající změny barvy pH indikátoru. Pozitivní varianty byly purifikovány a charakterizovány spektroskopii cirkulárního dichroismu a aktivních měření. Charakterizace pozitivních variant ukázala, že nejvíce strukturně stabilní a k přítomnosti dimethyl sulfoxidu tolerantní enzym byl mutant nesoucí substituci v přístupovém tunelu spojujícím aktivní místo enzymu s okolním prostředím.

Na základě těchto výsledků byla připravena sada mutantů nesoucích tunelové a povrchové mutace přítomné

v termostabilní DhaA vyvinuté Grayem a sp.<sup>2</sup>. Aktivitní měření prokázala, že enzymy nesoucí mutace v tunelu byly v pufru s dimethyl sulfoxidem více stabilní než divoký typ. Varianty se substitucemi v tunelu, v porovnání s výchozím enzymem, též vykazovaly vylepšenou strukturní termostabilitu. Modifikace přístupových tunelů představuje novou strategii pro inženýrství stability halogenalkandehalogenas.

*Tato práce vznikla za podpory grantů LC06010, IAA401630901 a MSM0021622412. Za finanční podporu zahraničních stáží TK patří poděkování FEMS a Universität Greifswald.*

#### LITERATURA

1. Kulakova A. N., Larkin M. J., Kulakov L. A.: *Microbiology* 143, 109 (1997).
2. Gray K. A., Richardson T. H., Kretz K., Short J. M., Bartnek F., Knowles R., Kan L., Swanson P. E., Robertson D. E.: *Adv. Synth. Catal.* 343, 607 (2001).

#### PRODUKCE VAKUOLÁRNÍCH CYTOKININ DEHYDROGENAS Z *Arabidopsis thaliana* V KVASINKÁCH *Pichia pastoris*

**MARTA KOWALSKA<sup>a</sup>, PETR GALUSZKA<sup>a</sup>, MÁRIA ŠMEHILOVÁ<sup>a</sup>, TIBOR BÉRES<sup>b</sup> a IVO FRÉBORT<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Katedra biochemie, PŘF, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc;* <sup>b</sup>*Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a AV ČR [mk3107@gmail.com](mailto:mk3107@gmail.com)*

Cytokininy jsou důležité signální molekuly v regulující dělení a diferenciaci rostlinných buněk<sup>1</sup>. Klíčovou roli v katabolismu cytokininů hraje enzym cytokinin dehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12), který přeměňuje cytokininy a jejich ribonukleosidy s nenasyceným postranním řetězcem na adenin nebo adenosin a příslušný aldehyd. CKX proteiny jsou u různých druhů vyšších rostlin kódovány malými genovými rodinami čítajícími několik členů<sup>2</sup>. Genová rodina CKX v *Arabidopsis thaliana* zahrnuje sedm členů (*AtCKX1-AtCKX7*). Isoenzymy *AtCKX* mají odlišné biochemické vlastnosti, regulaci exprese a různou buňčnou lokalizaci<sup>3</sup>.

Geny *AtCKX1* a *AtCKX3* kódující vakuolární cytokinin dehydrogenasy v *Arabidopsis thaliana* byly vybrány pro expresi proteinů v *Pichii pastoris*. Sekvence kódující *N*-terminální fragment, který podle programu SignalP 3.0 je vedoucím peptidem, byla v obou případech odstraněna před klonováním do pGAPZa vektoru a pro sekreci proteinů z kvasinkových buněk byla použita *N*-terminální signální sekvence  $\alpha$ -faktor. Počáteční experimenty bohužel nevedly k sekreci aktivních proteinů. Přesnější analýza aminokyselinné sekvence *AtCKX1* a *AtCKX3* odhalila přítomnost regionu podobajícího se *N*-terminálnímu sekvence-specifickému vakuolárnímu třídícímu signálu (ssVSS), který typicky zahrnuje degenerovaný signál [N/L]-[P/I/L]-[I/P]-[R/N/S] (také nazývaný NPIR consensus sequence) a cílí proteiny do lytických vakuol<sup>4</sup>. Aktivní

vakuolární cytokinin dehydrogenasy byly získány v *Pichia pastoris* jedině po odstranění tohoto motivu.

Po úspěšné expresi a purifikaci studovaných proteinů byly stanoveny jejich substrátové specifity a preference pro elektronové akceptory.

Tato práce vznikla za podpory grantů MSM 6198959216 a GAČR 522/06/0703.

#### LITERATURA

1. Mok D.W., Mok M.C.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 89 (2001).
2. Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O.: Plant Physiol. 125, 378 (2001).
3. Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina I.: J. Plant Res. 116, 241 (2003).
4. Vitale A., Raikhel N.V.: Trends Plant Sci. 4, 149 (1999).

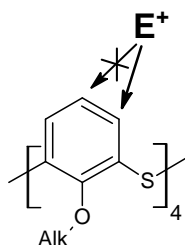
#### THIACALIXARENY – KRUCIÁLNÍ ROLE SULFIDICKÝCH MŮSTKŮ NA REAKTIVITU SYSTÉMU V POROVNÁNÍ S CALIXARENY

**ONDŘEJ KUNDRÁT, JAN KROUPA, MICHAL HIML, VÁCLAV EIGNER, MICHAELA POJAROVÁ, JAN BUDKA a PAVEL LHOTÁK**

Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice  
kundrato@vscht.cz

Thiacalix[4]areny, mající sulfidické spojky namísto methylenových a patřící do skupiny látek formálně odvozených od calixarenů, nacházejí své uplatnění v supramolekulární chemii, tj. v chemii zabývající se designem a syntézou látek vhodných ke studiu ne vazebných interakcí.

Zatímco v calixarenové chemii se požadovaných sloučenin pro studium těchto sil dosahuje metodou fixace skeletu v patřičné konformaci a následné substituci nebo naopak, fixace thiacalixarenů po předchozí substituci poskytuje jako hlavní produkt nežádoucí konformer. Výzkum reaktivity již tetraalkylovaného systému ukazuje, že právě přítomnost atomů síry významně ovlivňuje chování systému způsobem v chemii calixarenů nepopsaným – přímé *meta*-substituce aromatického systému, alkylace můstkových atomů.



Tato práce se zabývá výše zmíněnými modifikacemi thiacalixarenového skeletu, vedoucí v mnoha případech

jednoduchými postupy k inherentně chirálním látkám, a rozdíly s obdobnými postupy v calixarenové chemii.

Tato práce vznikla za podpory Grantovou agenturou České republiky (grant 203/09/0691) a Grantovou agenturou Akademie věd České republiky (grant IAAX08240901).

#### LITERATURA

1. Lhoták P.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1675.
2. Kundrát O., Císařová I., Böhm S., Pojarová M., Lhoták P.: J. Org. Chem. 74, 4592 (2009).
3. Kundrát O., Dvořáková H., Císařová I., Pojarová M., Lhoták P.: Org. Lett. 11, 4188 (2009).
4. Kundrát O., Dvořáková H., Eigner V., Lhoták P.: J. Org. Chem. 75, 407 (2010).

#### OXIDACE ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY I CYTOCHROMY P450 DIKTUJE JEJÍ KARCINOGENNÍ A NEFROTOXICKÉ ÚČINKY

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

<sup>a</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha 2,

<sup>b</sup>Německé centrum výzkumu rakoviny, 69 120 Heidelberg,

<sup>c</sup>Institut výzkumu rakoviny, Sutton, Surrey, SM2 5NG, Velká Británie

Karcinogenní a nefrotoxický rostlinný alkaloid, aristolochová kyselina I (AAI), je příčinou onemocnění, označovaného jako nefropatie vyvolaná AAI (aristolochic acid nephropathy, AAN). Pro chorobu je charakteristické chronické ledvinné selhání, tubulointersticiální fibrosa a nádory močových cest. AAI participuje i na vývoji podobné fibrosy provázené nádory močových cest, balkánské endemické nefropatie (BEN). Zajímavá je však skutečnost, že ne všichni jedinci vystavení působení AAI onemocní těmito chorobami. Možným vysvětlením mohou být rozdílné hladiny a aktivity enzymů metabolizujících AAI. V práci sledujeme detoxikaci AAI *in vivo* a *in vitro* za použití myších modelů s „deletovaným“ genem pro enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasu v játrech (HRN), který je esenciální pro funkci cytochromu P450. Oproti jaterním mikrosomům kontrolních zvířat (obsahujících jaterní NADPH:cytochrom P450 reduktázu), které oxidují AAI na AAIA, jsou mikrosomy HRN myši v oxidaci AAI prakticky neúčinné. Dále byly sledovány hladiny aduktů vytvářených AAI s DNA u studovaných zvířecích modelů, které byly vystavené působení AAI. Výsledky naznačují, že jaterní cytochromy P450 snižují aktuální koncentraci AAI jak v játrech, tak i v ledvinách, a tím je chrání před tvorbou aduktů s DNA<sup>1-4</sup>. Abychom zjistili, jakou úlohu v oxidaci AAI hrají jednotlivé cytochromy P450, použili jsme mikrosomální systémy myši, lidské, králičí a potkaní. Ze studií s lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 bylo zjištěno, že neúčinnější v oxidaci AAI jsou CYP1A1 a CYP1A2.



Tato práce vznikla za podpory grantových agentur GAČR (303/09/0472, 305/09/H008) a MŠMT ČR (0021620808).

## LITERATURA

- Schmeiser H.H., Stiborova M., Arlt V.M.: *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 141 (2009).
- Stiborová M., Frei E., Arlt V. M., Schmeiser H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55 (2008).
- Stiborová M., Frei E., Schmeiser H.H.: *Kidney Int.* 73, 1209 (2008).
- Šístková J., Hudeček J., Hodek P., Frei E., Schmeiser H.H., Stiborová M.: *Neuro Endocrinol Lett.* 29, 733 (2008).

### KVALITATIVNE A KVANTITATIVNE ASPEKTY TECHNIKY PREPÍNANIA KOLÓN V ZÓNOVEJ ELEKTROFORÉZE NA ČIPE

MILAN LUC, MARIÁN MASÁR a DUŠAN KANIANSKY

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovensko  
luc@fns.uniba.sk

Práca demonštruje analytický potenciál techniky prepínania kolón („column-switching“, CS) v on-line kombinácii zónová elektroforéza – zónová elektroforéza (ZE-ZE)<sup>1</sup> na čipe so systémom spájania kolón („column-coupling“, CC)<sup>2</sup>. CS technika je realizovaná pomocou časovo riadeného prepínania smeru hnacieho prúdu medzi separačnými kanálkami na CC čipe, čo umožňuje definovaný prenos analytu/-ov z prvého do druhého separačného kanálika s minimálnym počtom interferujúcich zložiek matrice. Experimenty boli zamerané na kvalitatívne a kvantitatívne aspekty ZE-ZE separácií (i) modelovej (13 anorganických a organických kyselín) a (ii) reálnej vzorky (modelová vzorka „spikovaná“ 25-krát riedeným močom). Moč reprezentoval multikomponentnú biologickú matricu. Vysoké reprodukovateľnosti kvalitatívnych (RSD hodnoty migračných časov do 0,4 %) a kvantitatívnych parametrov (RSD hodnoty plôch pík analytov do 2,9 %) boli dosiahnuté za preferovaných pracovných podmienok (eliminovaný hydrodynamický a elektroosmotický tok). Výťažnosti analytov prenesených z prvého do druhého separačného stupňa boli v rozmedzí 94-101 %.

V ZE-ZE experimentoch s reálnou vzorkou bol sledovaný vplyv matrice (moč) na kvalitatívne a kvantitatívne parametre modelových analytov. RSD hodnoty migračných časov analytov boli do 0,5 %, zatiaľ čo RSD hodnoty plôch pík boli v intervale 1,1–4,9 %. Výťažnosti analytov v reálnej vzorke prenesených do druhého separačného stupňa sa pohybovali od 95 do 105 %.

Dosiahnuté výsledky naznačujú široké aplikačné možnosti CS techniky realizovanej na CC čipe najmä v situáciách, keď vzorka obsahuje multikomponentnú matricu s rozličným koncentračným zastúpením jednotlivých zložiek.

Táto práca bola podporená grantovými agentúrami VEGA (č. 1/0672/09), APVV (VVCE-0070-07) a GUK (UK/307/2009).

## LITERATURA

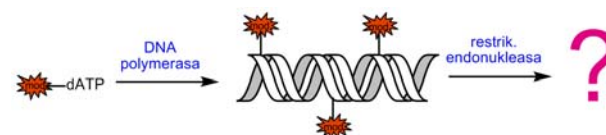
- Kaniansky D., Masár M., Danková M., Bodor R., Rákociová R., Pilná M., Jöhncck M., Stanislawski B., Kajan S.: *J. Chromatogr., A* 1051, 33 (2004).
- Kaniansky D., Masár M., Bodor R., Žúborová M., Őlvecká E., Jöhncck M., Stanislawski B.: *Electrophoresis* 24, 2208 (2003)

### ENZYMATICKÁ SYNTÉZA MODIFIKOVANÉ DNA A JEJÍ ŠTĚPENÍ RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEASAMI

HANA MACÍČKOVÁ-CAHOVÁ a MICHAL HOCEK\*

UOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
cahova@uochb.cas.cz

Funkcionalizované nukleové kyseliny priťahujú v posledných letech stále väčšiu pozornosť. Nejenže nám môžu pomoci pri pochopení interakcií DNA či RNA s proteínmi, ale môžu také sloužit v řadě dalších aplikací, ať už se jedná o nanotechnologie či bioanalysu. V naší skupině jsme vyvinuli novou dvoukrokovou metodiku přípravy DNA nesoucí modifikaci na nukleových bazích. Vodné cross-coupling reakce halogenovaných deoxynukleosid trifosfátů (dNTP) s funkcionalizovanými boronovými kyselinami vedly k syntéze modifikovaných dNTP, které byly následně inkorporovány za využití polymeras do různých sekvencí ať už v primer extension experimentu nebo v polymerasové řetězové reakci<sup>1,2,3</sup>. Ta ovšem nedovoluje přípravu DNA modifikované pouze v definované pozici, ale vzniká několikanásobně modifikovaná DNA. Pro přípravu DNA nesoucí modifikaci ve specifické poloze je třeba zvládnout práci s klasickými prostředky molekulární biologie například restričními endonukleasami či ligasami. Proto jsme se soustředili na studium interakce DNA nesoucí různé substituenty na bazích s některými běžně používanými restričními endonukleasami. Ukázalo se, že menší modifikace jako například acetylen v cílové sekvenci jsou některými restričními endonukleasami velmi dobře tolerovány. Ovšem jakákoliv stericky náročnější skupina počínaje fenylem může být využita při chránění DNA před štěpením těmito enzymy<sup>4</sup>.



**Schéma 1.** Enzymatická syntéza modifikovanej DNA a následná interakce DNA s restričními endonukleasami

Tato práce je součástí výzkumného projektu Z4 055 0506, podporována Centrem pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy (LC 512), Grantovou agenturou České



republiky (203/09/0317) a Výzkumným centrem Gilead science, Inc. (Foster City, CA).

## LITERATURA

1. Čapek P., Cahová H., Pohl R., Hocek M., Gloeckner C., Marx A.: Chem. Eur. J. 13, 6196 (2007).
2. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: Angew. Chem., Int. Ed. 47, 2059 (2008).
3. Cahová H., Pohl R., Bednářová L., Nováková K., Cvačka J., Hocek M.: Org. Biomol. Chem. 6, 3657 (2008).
4. Macíčková-Cahová H., Hocek M.: Nucleic Acids Res. 37, 7612 (2009).

ANALÝZA P53 MUTACÍ *IN VITRO* A *IN VIVO*

**JITKA MALČÍKOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN TRBUŠEK<sup>a</sup>, JANA ŠMARDOVÁ<sup>b</sup>, JIRÍ DAMBORSKÝ<sup>c</sup>, PETR KUGLÍK<sup>d</sup>, BORIS TICHÝ<sup>a</sup>, JIRÍ MAYER<sup>a</sup> a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, FN Brno a LF MU, 625 00 Brno; <sup>b</sup>Ústav patologie, FN Brno, 625 00 Brno; <sup>c</sup>Loschmidt Laboratories, UEB a NCBI PŘF MU Kamenice 5/A4, 625 00; <sup>d</sup>Oddělení lékařské genetiky, FN Brno, Černopolská 9, 625 00 Brno  
jmalcikova@fnbrno.cz

Nádorový supresor p53 je ústředním regulátorem buněčného cyklu. Funguje převážně jako transkripční faktor a základním předpokladem pro jeho funkci je vazba k DNA. Jako klíčový protein zabraňující maligní transformaci bývá u nádorů často poškozen. Už vyřazení jedné alely vede k jeho nedostatečné funkci. V případě bodových mutací je navíc exprimován protein se změněnými vlastnostmi. U chronické lymfocytární leukémie (CLL) je přítomnost delecí genu *TP53* důležitým negativním prognostickým faktorem<sup>1</sup>, zatímco význam mutací je intenzivně studován teprve v poslední době. V naší práci se zabýváme komplexní analýzou p53 mutací na několika úrovních *in vitro* i *in vivo*.

S využitím funkčních proteinových čipů umožňujících paralelní sledování DNA-vazebných schopností několika p53 mutovaných proteinů současně jsme zjistili, že mutant p53-R337C vykazuje vysokou vazbu k responzivním elementům cílových genů, srovnatelnou s wild-type proteinem. V reportérových genových testech však tento mutant transaktivoval cílové promotory pouze částečně a pomocí PCR v reálném čase jsme zjistili, že endogenní promotory nejsou mutantem R337C aktivovány téměř vůbec.<sup>2</sup> *In vivo* jsme pak na souboru 70 CLL pacientů s p53 abnormalitami studovali asociaci p53 delecí a mutací, vliv jednotlivých abnormalit na přežití pacientů a mechanismy vzniku p53 defektů. Ukázali jsme, že nejčastěji dochází ke kompletní inaktivaci genu delecí jedné a mutací druhé alely. Samotné delece jsou vzácné, ale samotné mutace se vyskytují poměrně často a mají významný negativní vliv na prognózu. Vznik nových p53 defektů je silně asociován s předcházející léčbou<sup>3</sup>.

Naše výsledky ukazují, že samotná vazba p53 k DNA není dostatečná pro účinnou transaktivaci cílových genů a závěry získané *in vitro* nemusí vždy odpovídat reálné situaci v buňce. U CLL jsme doložili prognostický význam monoalelických p53 abnormalit (zejména mutací) a ukázali jsme, že na vzniku nových p53 defektů se významně podílí léčba, pravděpodobně prostřednictvím selekce rezistentních klonů.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZČR NS9858-4/2008 a NS10439-3/2009.

## LITERATURA

1. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P.: N. Engl. J. Med. 343, 1910 (2000).
2. Malcikova J., Tichy B., Damborsky J., Kabathova J., Trbusek M., Mayer J., Pospisilova S.: Biol. Chem., v tisku.
3. Malcikova J., Smardova J., Rocnova L., Tichy B., Kuglik P., Vranova V., Cejkova S., Svitakova M., Skuhrova Francova H., Brychtova Y., Doubek M., Brejcha M., Klabusay M., Mayer J., Pospisilova S., Trbusek M.: Blood 114, 5307 (2009).

AKTIVACE A DETOXIKACE BENZO[A]PYRENU CYTOCHROMEM P450 1A1 *IN VIVO* A *IN VITRO*

**MICHAELA MOSEROVÁ<sup>a</sup>, VĚRA KOTRBOVÁ<sup>a</sup>, DAGMAR AIMOVÁ<sup>a</sup>, MIROSLAV ŠULC<sup>a</sup>, VOLKER M. ARLT<sup>c</sup>, EVA FREI<sup>b</sup> a MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Univerzita Karlova v Praze, Katedra biochemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2 <sup>b</sup>Německé centrum výzkumu rakoviny, 69 120 Heidelberg <sup>c</sup>Institut výzkumu rakoviny, Sutton, Surrey SM2 5NG, Velká Británie  
moserova@seznam.cz

Karcinogenní benzo[a]pyren (BaP) po aktivaci cytochromy P450 (CYP) kovalentně modifikuje DNA. Nedávné studie ukazují, že CYP1A1, dříve považovaný za nejdůležitější enzym aktivující BaP<sup>1</sup>, může participovat spíše na jeho detoxifikaci než metabolické aktivaci, čímž chrání organismy proti toxicitě tohoto karcinogenu<sup>2,3</sup>. V práci jsme sledovali tvorbu aduktů aktivovaného BaP s DNA a indukci enzymů a proteinů participujících na jeho metabolismu (CYP1A1/2, NADPH:CYP reduktasy, epoxid hydrolasy a cytochromu b<sub>5</sub>) *in vivo*, v játrech modelového organismu myši. Cílem studie bylo zjistit, které enzymy se skutečně podílí na metabolické aktivaci BaP, a zda tato sloučenina ovlivňuje svou vlastní metabolickou aktivaci.

BaP zvyšuje expresi a aktivity CYP1A1/2 v játrech experimentálních modelů (laboratorní myš a potkan). BaP je rovněž schopen vytvářet adukty s DNA, především v játrech studovaných organismů. Vlivem indukce CYP1A1/2 a dalších aktivačních enzymů dochází ke stimulaci vzniku metabolitů BaP, které vytvářejí adukty s DNA *in vitro*. BaP je oxidován purifikovaným CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou za tvorby BaP-chinonu, 9-

hydroxy- a 3-hydroxy-BaP. Naproti tomu v mikrosomálnom systéme obsahujúcom okrem cytochromu P450 a jejich reductasy tiež cytochrom b<sub>5</sub> a epoxid hydrolasu je BaP oxidovaný na šesť metabolitů; 9,10-diol-, 4,5-diol a 7,8-diol-BaP, BaP-chinon, 9-hydroxy a 3-hydroxy-BaP. Prítomnosť epoxid hydrolasy a cytochromu b<sub>5</sub> v rekonstituovanom systéme CYP1A1 a jeho reductasy modulujú hladiny dvoch majoritných aduktů tvorených z 9-hydroxy-BaP a 7,8-diol-9,10-epoxid BaP. Výsledky potvrdzujú, že BaP indukuje CYP1A1/2, a tak moduluje vlastnú metabolickú aktiváciu a detoxikáciu vedúcu k vývoju nádorových chorôb.

*Tato práce vznikla za podpory grantových agentur GAČR (303/09/0472, 305/09/H008), MŠMT (0021620808) a GAUK (127208).*

#### LITERATURA

1. Baird W.M., Hooven L.A., Mahadevan B.: Environ. Mol. Mutagen 45, 106 (2005).
2. Uno S., Dalton T.P., Dragin N., Curran C.P., Derkenne S., Miller M.L., Shertzer H.G., Gonzalez F.J., Nebert D.W.: Mol. Pharmacol. 69, 1103 (2006).
3. Arlt V.M., Stiborová M., Henderson C.J., Thiemann M., Frei E., Aimová D., Singh R., Gamboa da Costa G., Schmitz O.J., Farmer P.B., Wolf C.R., Phillips D.H.: Carcinogenesis 29, 656 (2008).

#### MUTÁCIE FUNKČNÝCH OBLASTÍ TLR1, TLR2 A TLR4: ICH VPLYV NA VNÍMAVOSŤ VOČI PARATUBERKULÓZE U HOVÄDZIEHO DOBYTKA

**RASTISLAV MUCHA<sup>a\*</sup>, MANGESH BHIDE<sup>a,b</sup>, LUCIA KISOVÁ-VARGOVÁ<sup>b</sup>, IVAN MIKULA jr.<sup>b</sup> a IVAN MIKULA sr.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 854 10 Bratislava; <sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika [rastislavmucha@gmail.com](mailto:rastislavmucha@gmail.com)

Toll-like receptory (TLR) sú, ako transmembránové proteíny, dôležitou súčasťou nešpecifickej imunity a majú významnú úlohu v navodení obrany voči infekcii, vrátane *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Na základe mykobakteriálnej teórie prejavu paratuberkulózy existuje predpoklad, že mutácie v génoch TLR vyvolávajú neschopnosť týchto receptorov reagovať na špecifické znaky patologických mikroorganizmov (tzv. PAMP) a tým sa neaktivuje ani následná imunitná zápalová odpoveď.

Práca bola zameraná na detekciu mutácií génov TLR1, TLR2, TLR4 a určenie vzťahu medzi mutáciami a vnímavosťou voči MAP infekcii. Na základe poznatkov o TLR1 a TLR4 géne<sup>1</sup> sme sa pri detekcii mutácií v týchto génoch zamerali na extracelulárnu (LRR) doménu zodpovednú za rozpoznávanie PAMP. U TLR1 sme objavili mutáciu Val220Met v LRR10 doméne na deviatej pozícii (LLR doména je zložená z 11 aminokyselín). Prítomnosť metionínu na tejto pozícii môže spôsobiť zoslabenie

vodíkových väzieb v proteínovej štruktúre LRR, čo vedie ku zníženej afinitě voči bakteriálnym PAMPom<sup>2</sup>, teda táto mutácia môže spôsobiť zvýšenú vnímavosť voči MAP infekcii. U TLR4 sme dokázali, že časť extracelulárnej domény LRR11 je najviac polymorfným motívom v nami študovaných oblastiach LRR11 až LRR16. Mutácie na vonkajšej časti tejto štruktúry, napr. mutácia na štvrtej pozícii od LRR motívu, môžu ovplyvniť naviazanie PAMP na LRR<sup>3</sup>. Nami detegovaná mutácia u TLR4 na pozícii Asp299Gly je jedným z najlepších príkladov mutácie na štvrtej pozícii od LRR, ktorá spôsobuje zvýšenie vnímavosti voči MAP infekcii.

U TLR2 má veľký význam v prenose signálu vnútrobunková (TIR) doména. Podarilo sa nám detegovať mutáciu na pozícii Arg677Trp, ktorá mala výrazne preventívny charakter pre vnímavosť voči paratuberkulóze. Taktiež sme detegovali mutáciu na pozícii Arg753Gln. Táto tvorila výrazný *risk faktor* a v populácii, v ktorej sa vyskytovala, podstatne zvyšovala vnímavosť voči MAP infekcii.

*Táto publikácia, bola vytvorená realizáciou projektu INFECTZOON – Centrum excelentnosti pre nákazy zvierat a zoonózy, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50% podiel) a na základe podpory grantu MŠSR VEGA-1/0608/09 (50% podiel).*

#### LITERATÚRA

1. Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y.: BMC Genomics 8, 124 (2007).
2. Matsushima N., Tachi N., Kuroki Y., Enkhbayar P., Osaki M., Kamiya M., Kretsinger R.H.: Cell Mol. Life Sci. 62, 2771 (2005).
3. Bell J.K., Mullen G.E., Leifer C.A., Mazzoni A., Davies D.R., Segal D.M.: Trends Immunol. 24, 528 (2003).

#### STUDIUM MOLEKULÁRNYCH PODSTATY POLYCYTHEMIA VERA

**EVA OTÁHALOVÁ<sup>a</sup> a JOSEF T. PRCHAL<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2, <sup>b</sup>University of Utah, Salt Lake City, UT, USA [eva.otahalova@uhkt.cz](mailto:eva.otahalova@uhkt.cz)

Polycythemia vera (PV) je klonální hematologické onemocnění charakterizované zvýšenou erytropoézou. U více než 95 % pacientů s PV je detegována somatická bodová mutace v oblasti kódující tyrosinovou kinázu JAK2 (*JAK2 V617F*). Tato mutace vede ke konstitutivní aktivaci JAK2 a následně k abnormálně zvýšené erytropoéze. Přesná úloha této mutace při vzniku PV však zůstává neobjasněná. Současný výzkum se soustřeďuje na popis událostí, které expresi *JAK2 V617F* předchází. Náš projekt se proto zaměřuje na studium raných erytroidních progenitorů a na

vytipování dalších potenciálních genů či deregulací významných pro vznik a vývoj PV.

Mononukleární buňky (MNC) izolované z periferní krve 12 PV pacientů a 5 zdravých dárců jsme pomocí 21 denní *in vitro* kultury v trifázovém tekutém mediu<sup>1</sup> diferenciovali do erytroidní linie. Ve vzorcích napříč kultivací (den 1, 7, 14, 21) jsme pomocí BeadChip Illumina technologie sledovali genovou expresi a získaná data statisticky analyzovali v programu R<sup>2</sup>. Výsledky jsme ověřili pomocí RT-PCR v reálném čase na rozšířeném souboru vzorků.

Použitá *in vitro* metoda umožnila selekci homogenních populací jednotlivých stádií erytroidních progenitorů z velmi heterogenní populace, jakou tvoří krevní MNC. Pomocí komparativních analýz jsme vytypovali skupinu kandidátních genů asociovaných s PV a deregulovaných v jednotlivých stádiích erytroidní expanze. Výsledky jsme dále korelovali s expresním profilem miRNA<sup>3</sup> popsaném na souboru erytroidních progenitorů získaných za stejných podmínek.

Ačkoliv existuje řada komerčně dostupných programů pro předpověď potenciálních cílů jednotlivých miRNA, v některých případech vedou počítačové analýzy k výběru biologicky nerelevantních dat. Korelace expresních profilů miRNA a mRNA je tedy důležitá pro objasnění funkcí jednotlivých miRNA. V našem případě nabízí současné studium expresních profilů miRNA a mRNA na stejných vzorcích erytroidních progenitorů možnost detailnějšího poznání molekulární podstaty a patologie polycythemia vera.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 200095.*

#### LITERATURA

1. Gaikwad A., Nussenzveig R., Prchal J.T.: *Exp. Hematol* 35, 587 (2007).
2. Otahalova E., Bruchova H., Necas E., Prchal J.T.: *Vnitř. Lek.* 54, P61 (2008).
3. Bruchova H., Yoon D., Agarwal A.M., Mendell J., Prchal J.T.: *Exp. Hematol.* 35, 1657 (2007).

#### PLODY *Lonicera caerulea* L.: OD FYTOCHEMIE PO APLIKACI

**IRENA PALÍKOVÁ<sup>a\*</sup>, KATEŘINA VALENTOVÁ<sup>a</sup>, JAN ROHEL<sup>b</sup>, SIMONA KAPRÁLOVÁ<sup>b</sup>, VILÍM ŠIMÁNEK<sup>a</sup> a JITKA ULRICOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc; <sup>b</sup>Klinika zubního lékařství, Palackého 12, 772 00 Olomouc  
i.palikova@gmail.com

*Lonicera caerulea* L. (zimolez modrý) je původním keřem severní polokoule. Plody jsou bohatým zdrojem anthokyaninových barviv. V tradičním léčitelství Ruska a Číny se proto využívají pro své protizánětlivé a chemo-preventivní účinky<sup>1</sup>. Cílem naší práce bylo analyzovat složky plodu zimolezu modrého, připravit frakci bohatou na biologicky aktivní látky a dokázat její příznivé účinky *in vitro* i *in vivo*.

V plodech zimolezu modrého byla potvrzena přítomnost velkého množství fenolových látek, především anthokyaninů (kvanidin-3-glukosid), které jsme pro studium biologické aktivity zkoncentrovali do fenolové frakce (FF; 80 % anthokyaninů). Na subbuněčných modelech vykazovala FF redukční kapacitu, inhibovala radikálové poškození potkaních mikrosomálních membrán vyvolané *tert*-butylhydroperoxidem (*t*BH) i oxidaci lidských lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) indukovanou mědí<sup>2</sup>. V koncentraci 1000 µg·ml<sup>-1</sup> vykazovala cytoprotektivní účinek na primární kultury potkaních hepatocytů a lidských endotelových buněk (HUVEC) po intoxikaci *t*BH (0,5 mmol·l<sup>-1</sup>; 1,5h), v koncentraci 0,1 µg·ml<sup>-1</sup> na HUVEC po poškození oxidovanými LDL (200 µg·ml<sup>-1</sup>; 2h). Protizánětlivé účinky celých plodů *L. caerulea* L. (10 %) v kombinaci s omega-3 polynenasycenými mastnými kyselinami (5 %) byly potvrzeny na modelu zánětu tlustého střeva vyvolaného dextran-sulfátem sodným (5 %) u potkanů kmene Wistar. Experiment byl hodnocen histologickou analýzou tenkého a tlustého střeva a měřením parametrů oxidačního stresu (cyklooxygenasa, myeloperoksidasa, produkty lipoperoxidačního poškození, glutathionreduktasa, glutathiontransferasa).

Jednou z možností aplikace FF *Lonicera caerulea* L. je léčba pacientů s diagnostikovanou gingivitidou a parodontitidou. Frakce v kombinaci s extraktem *Macleaya cordata* ve formě zubního gelu příznivě působila na podpurné a pojivové tkáně zubu, zabraňovala adherenci gram-negativních bakterií, hlavní příčiny vzniku parodontálního onemocnění.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 6198959216 a FT-TA3/024.*

#### LITERATURA

1. Heinrich J., Švarcová I., Valentová K.: *Chem. Listy* 102, 245 (2008).
2. Palíková I., Heinrich J., Bednář P., Marhol P., Křen V., Cvak L., Valentová K., Růžička F., Holá V., Kolář M., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 11883 (2008).

#### NEGATIVNÍ VLIV RETROTRANSPONU LINE-1 NA LIDSKÝ GENOM: NOVÁ MOLEKULÁRNÍ PŘÍČINA VZNIKU β-TALASÉMIE

**LUCIE PITERKOVÁ, JANA KUČEROVÁ a VLADIMÍR DIVOKÝ**

Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc  
lucie.piterkova@upol.cz

Lidský genom obsahuje více než 500 000 kopií LINE-1 retrotransponu (long interspersed nuclear element, LINE-1, zkráceně L1), které představují zhruba 17 % jeho obsahu. L1 element se tak stal, co do počtu, nejúspěšnější sekvencí v rámci lidské evoluce. Retrotransposičně aktivních je v současné době pouze 100 kopií, které svou insercí mohou

kvantitativně a kvalitativně ovlivnit expresi mnoha genů. Většina de novo L1 insercí nemá vliv na lidský organismus, nicméně mohou se projevit i jako negativní mutageny a stát se tak příčinou řady lidských onemocnění<sup>1</sup>.

Inserce funkčního retrotransposonu L1 (6 kb, GenBank: AF149422) do druhého intronu  $\beta$ -globinového genu je úplně novou etiologií  $\beta$ -talasémie u matky a dcery z ČR.  $\beta$ -talasémie jsou vrozené chronické anémie, vznikající v důsledku snížení, nebo absence syntézy  $\beta$ -globinového polypeptidového řetězce.

Spojením L1<sup>+</sup> EBV transformovaných lymfocytů s myšími erytroleukemickými buňkami (MEL) jsme vytvořili buněčnou linii, která nám umožnila charakterizovat vliv přítomnosti L1 elementu na funkci  $\beta$ -globinového genu u postižených jedinců. Insercí L1 elementu do  $\beta$ -globinového genu poklesla hladina mRNA u mutované alely na 10 – 15 %. Majoritní podíl připadá na správně sestříženou formu mRNA, minoritní pak na 3 aberantní varianty. Zjistili jsme, že aberantní varianty jsou eliminovány mechanismem degradace defektních mRNA (nonsense mediated decay); při zablokování této dráhy se jejich exprese 2x zvýší. Dále jsme dokázali, že regulační enhancerová oblast na 3' konci  $\beta$ -globinového genu u mutované alely je methylovaná, narozdíl od kontroly. Po odstranění methylace zůstává však exprese nezměněna, z čehož usuzujeme, že methylace enhancerové oblasti není primární příčinou poklesu hladiny  $\beta$ -globinové mRNA, ale jen sekundárním jevem souvisejícím s dislokací promotoru a enhanceru. L1 element také ovlivňuje míru aktivity z  $\beta$ -globinového promotu, která byla u mutované alely snížena o 30 %.

Molekulárních mechanismů, kterými L1 element moduluje expresi lidských genů, bylo popsáno několik<sup>2</sup>. V současné době však není jasné, které z nich a jakým způsobem přispívají k výslednému patologickému fenotypu. Jejich odhalení je důležité pro pochopení skutečného evolučního významu retrotransposonů a jejich funkce.

*Tato práce byla podpořena granty MZ ČR NS9935-3 a MŠMT 6198959205.*

#### LITERATURA

1. Belancio P., Deininger P.: *Genome Res.* 18, 3 (2008).
2. Han J.S., Szak S.T., Boeke J.D.: *Nature* 429, 6989 (2004).

#### VLIV OXIDU DUSNATÉHO NA PRODUKCI HEAT SHOCK PROTEINŮ

**JANA PITERKOVÁ<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a,\*</sup>, ZUZANA MATULKOVÁ<sup>a</sup> a BARBORA MIESLEROVÁ<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Katedra biochemie, <sup>b</sup>Katedra botaniky, PŘF, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, marek.petrivalsky@upol.cz

Na rostliny působí řada abiotických a biotických stresových faktorů, jako je vysoká a nízká teplota, těžké kovy, UV záření nebo útok patogenů<sup>1,2</sup>. Vystavení těmto

stresovým podmínkám vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), k nimž patří zejména oxid dusnatý (NO) a peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>1</sup>. Teplotní stres spolu s dalšími stresy způsobuje denaturaci nebo agregaci proteinů vedoucí až k buněčné smrti. Heat shock proteiny (Hsp), jejichž zvýšená produkce je charakteristická pro teplotně stresované organismy, působí v regulaci membránové fluidity a homeostáze proteinů a v ochraně před buněčnou smrtí<sup>3</sup>. Prezentovaná práce je zaměřena na stanovení exprese Hsp70 proteinů u dvou genotypů *Lycopersicon* spp. vlivem působení teplotního stresu, patogeneze (*Oidium neolyopersici*) a kombinace těchto stresových faktorů, dále byl studován vliv modulatorů koncentrace ROS a RNS. Mezi testované látky modulující koncentraci ROS a RNS patří donor NO (GSNO), lapač NO (PTIO) a inhibitor NADPH oxidasy (DPI). V rámci dané studie byl porovnán vliv teplotního a chladového stresu na produkci Hsp70 proteinů u dvou genotypů *Lycopersicon* spp. realizovaný na intaktních rostlinách a na listových discích. Chladový stres neměl výrazný vliv na produkci Hsp70 proteinů na rozdíl od teplotního stresu. V případě listových disků byl detekován nárůst produkce Hsp70 proteinů jako důsledek mechanického poškození rostlinného pletiva. Následující experimenty byly realizovány na listových discích vystavených teplotnímu stresu v prostředí modulatorů koncentrace ROS a RNS. Metodou Western blot byl prokázán vliv abiotického stresu, biotického stresu a jejich kombinace a regulační vliv koncentrace ROS a RNS na expresi Hsp70 proteinů. Během experimentu byly detegovány dva proteiny Hsp70 rodiny lišící se molekulovou hmotností, a to teplotně-inducibilní protein Hsp72 a konstitutivně exprimovaný protein Hsp75. Vlivem patogeneze nebo působením modulatorů koncentrace ROS a RNS docházelo ke zvýšení exprese Hsp75 proteinu. Byla také nalezena korelace mezi ROS a RNS a expresí Hsp70 proteinu.

*Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM 6198959215 a grantu GAČR 522/08/H003.*

#### LITERATURA

1. Pastori G. M., Foyer C. H.: *Plant Physiol.* 129, 460 (2002).
2. Smirnov N.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 214 (1998).
3. Parsell D. A., Lindquist S.: *Annu. Rev. Genet.* 27, 437 (1993).

#### TRANSKRIPČNÍ REGULACE CHAPERONOVÉHO SYSTÉMU HSP70 A HSP90 V NÁDOROVÉ BUŇCE

**EVA RŮČKOVÁ, PETR MÜLLER a BOŘIVOJ VOJTĚSEK**

Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno ruckova@mou.cz

Molekulární chaperony se podílejí na vytváření správné konformace polypeptidových řetězců po translaci, zabraňují jejich agregaci, umožňují proteinům vykonávat biologické

funkce, ale účastní se také jejich proteolytického odbourávání.

Pro nádorové buňky je vysoká aktivita chaperonů nezbytnou podmínkou pro překonání stresových podmínek způsobených genetickou nestabilitou, hypoxií nebo nadměrnou proliferací. Pro nádorovou buňku je zvláště důležitý protein Hsp90, který se podílí na stabilizaci řady onkogenních proteinů. Přestože je dlouhodobě známo, že ATPázová aktivita Hsp90 je u nádorové buňky v porovnání s buňkou nenádorovou až 100-násobně zvýšena, není přesně znám molekulární mechanismus vedoucí k těmto změnám. Hsp90 je v nádorových buňkách asociován s dalšími chaperony a ko-chaperony do multi-proteinových komplexů, které zprostředkovávají účinný folding a stabilizaci klientních proteinů. Lze se domnívat, že exprese ko-chaperonů, specifických proteinů kooperujících s Hsp90, může být jedním z důležitých faktorů zodpovědných za zvýšení aktivity Hsp90 v nádorových buňkách.

Z hlediska regulace rovnováhy mezi skládáním konformace proteinu nebo naopak jeho degradací jsou zajímavé ko-chaperony HOP a CHIP, které interagují s C-koncovou doménou Hsp90 a Hsp70. Protein HOP (Hsp70/Hsp90 organizing protein) zprostředkovává přenos klientních proteinů z Hsp70 na Hsp90 a podporuje tak skládání proteinů. Pro své schopnosti zesilovat funkci Hsp90 je považován za potenciální onkogen. Protein CHIP má naopak schopnost ubikvitinovat jak chaperony, tak i jejich klientní proteiny, a je proto odpovědný za jejich odbourávání proteazomem. Pro svou schopnost degradovat klienty Hsp90 je ko-chaperon CHIP pokládán za kandidátní tumor supresorový gen. Analýza exprese chaperonů v nádorových buňkách ukázala, že exprese proteinu CHIP byla stabilní, zatímco u proteinu HOP se zvyšovala po aktivaci HSF (heat shock factor) prostřednictvím inhibice Hsp90 a byla inhibována při nedostatku růstových stimulů.

Tyto rozdíly v regulaci exprese obou ko-chaperonů jsou v souladu s výsledky analýzy promotorových sekvencí. Promotor genu kódujícího CHIP má znaky typické pro house-keeping geny, obsahuje CpG ostrovy a SP1 vazebná místa. V promotoru genu pro HOP se naopak nachází dva vazebné elementy pro HSF a také několik vazebných míst pro onkogenní transkripční faktory, jako jsou E2F a c-myc. Zvýšená exprese ko-chaperonu HOP způsobená onkogenními transkripčními faktory může přispívat k nadměrné aktivitě Hsp90 a stabilizaci jeho klientních proteinů u nádorů. Indukce exprese proteinu HOP v důsledku inhibice Hsp90 může také omezovat terapeutický efekt inhibitorů Hsp90 narušením rovnováhy mezi hladinami obou ko-chaperonů a zamezením degradace klientních proteinů ubikvitin ligázou CHIP. Ko-chaperon HOP je z těchto důvodů nadějným cílem protinádorové terapie, který by mohl potencovat účinky inhibitorů Hsp90.

Tato práce je podporována granty GACR 301/08/1468 a MZ0M0U2005.

## SYNTÉZA MONOSUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ CYKLODEXTRINŮ JAKO PREKURZORŮ PRO DALŠÍ APLIKACE

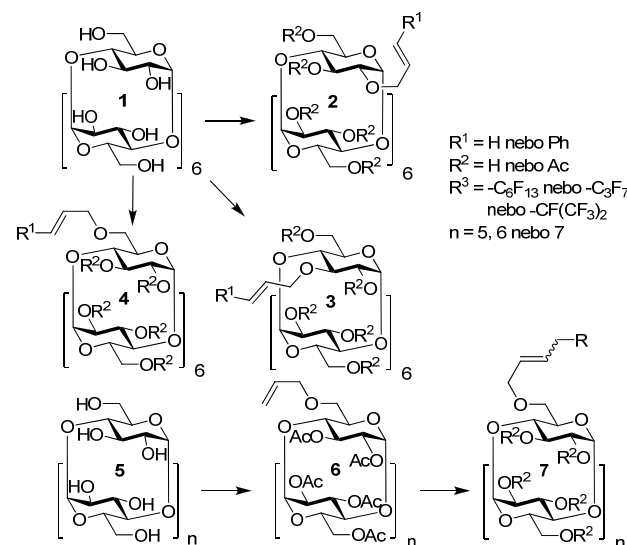
MICHAL ŘEZANKA<sup>a</sup>, JINDŘICH JINDŘICH<sup>a</sup>  
a MARTIN KOTORA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6  
rezanka@natur.cuni.cz

Cykloextriny<sup>1</sup> jsou cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickou vazbou, které tvoří rigidní kavitu. Těto strukturální vlastnosti cykloextrinů i jejich derivátů je hojně využíváno v chemické praxi. Aby bylo možné rozšířit využití cykloextrinů, je nezbytné připravit jejich vhodné deriváty.

Naše skupina se zabývá převážně syntézou monosubstituovaných derivátů cykloextrinů. Velmi výhodnými skupinami pro tuto monoderivatizaci jsou allylová nebo cinnamylová skupina<sup>2</sup>, jelikož obsahují dvojnou vazbu, která je široce modifikovatelná.

Náš výzkum je zaměřen na přípravu allyl a cinnamyl derivátů  $\alpha$ -CD (2–4) a derivátů  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cykloextrinů 7 s fluorovanými postranními řetězci pro biomedicínské aplikace<sup>3</sup> a studium agregačních vlastností 7 ve vodě.



Tento projekt je podporován granty MSM0021620857, IAA 400550609 a KAN 200200651.

### LITERATURA

- Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
- Jindřich J., Tišlerová I.: J. Org. Chem. 70, 9054 (2005).
- Abla M., Durand G., Pucci B.: J. Org. Chem. 73, 8142 (2008).

## NOVÝ PŘÍSTUP K AZAHELICENŮM A JEJICH VYUŽITÍ JAKO ORGANOKATALYZÁTORŮ PŘI ASYMETRICKÉ KINETICKÉ RESOLUCI RACEMICKÝCH ALKOHOLŮ

MICHAL ŠÁMAL, JIŘÍ MÍŠEK, IRENA G. STARÁ\* a IVO STARÝ\*

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

Finálním krokem při syntéze plně aromatických azahelicenů, který byl dosud v naší skupině používán, byla oxidativní aromatizace tetrahydroazahelicenů vzniklých [2+2+2] cykloisomerizací příslušných triynů. Aromatizace byla prováděna oxidem manganičitým za asistence mikrovlnného záření<sup>1</sup>.

Z důvodů zvýšení výtěžků aromatizace byl navržen alternativní postup. Cyklotrimerizační reakcí byl připraven disubstituovaný tetrahydro[5]helicen, u kterého bylo možné efektivně provést aromatizaci kysele katalyzovanou eliminací kyseliny octové. Oxidativní aromatizace byla tedy nahrazena eliminačním mechanismem (Schéma 1). Kromě výrazného zvýšení výtěžku aromatizace byl zároveň snížen celkový počet reakčních kroků, což vedlo k vyššímu celkovému výtěžku aza[5]helicenu. Popsaný postup byl rovněž úspěšně aplikován při syntéze azahexahelicenů.

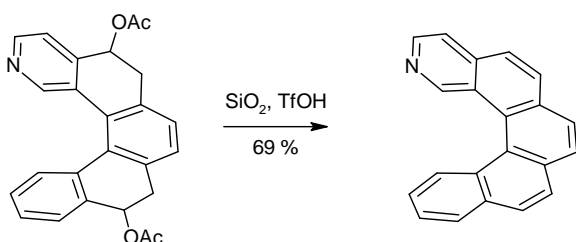


Schéma 1

Přítomnost nukleofilního a koordinujícího pyridinového dusíku ve spojení s helikální chiralitou molekuly předurčuje azaheliceny k využití v organokatalýze a jako ligandy při enantioselektivních reakcích katalyzovaných komplexy kovů. Optický čistý enantiomer 2-aza[6]helicenu byl použit při kinetické resoluci sekundárních alkoholů, především racemického 1-fenylethanolu<sup>2</sup>.

Tato práce vznikla za podpory GA AV ČR (reg. č. IAA400550916), MŠMT (Centrum pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg. č. LC512) a ÚOCHB AV ČR (tato studie je součástí výzkumného záměru Z4 055 0506).

### LITERATURA

- Míšek J., Teplý F., Stará I. G., Tichý M., Šaman D., Císařová I., Vojtíšek P., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2074 (2008).
- Šámal M., Míšek J., Stará I. G., Starý I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1151 (2009).

## RESOLUCE HELQUATŮ NA ENANTIOMERY

LUKÁŠ SEVERA, LOUIS ADRIAENSSENS, JAN VÁVRA, DUŠAN KOVAL, VÁCLAV KAŠIČKA a FILIP TEPLÝ\*

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

Nedávno jsme vyvinuli třístupňovou syntézu nové třídy helikálních extendovaných diquatů (helquatů). Helquaty představují novou kombinaci strukturálních motivů typických pro helicity a viologen<sup>1</sup>. Lze očekávat, že propojení těchto dosud oddělených oblastí výzkumu otevře atraktivní badatelská témata<sup>1,2</sup>. Jelikož je helikální chiralita dominantní vlastností těchto nových systémů, zaměřili jsme se po úspěšném zvládnutí syntézy racematů na přípravu helquatů v opticky čisté formě.

Ionický charakter helquatů umožňuje využití výměny nechirálního aniontu za opticky čistý anion, čímž směs dvou enantiomerů snadno převedeme na směs dvou diastereoisomerů. Odlišná rozpustnost takových diastereoisomerů je klíčem k resoluci helquatů na enantiomery. Výhodou tohoto přístupu je dobrá dostupnost řady chirálních aniontů odvozených od levných přírodních kyselin<sup>3</sup>.

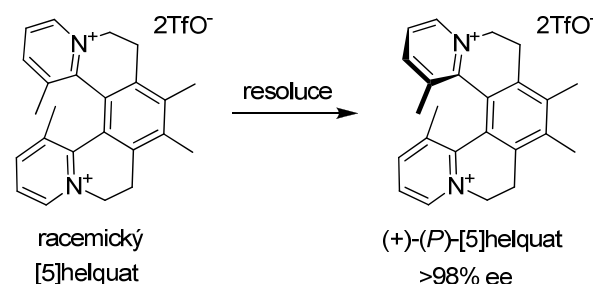


Schéma 1. Resoluce [5] helquatu

Pro určení zastoupení jednotlivých enantiomerů helquatu představujeme kapilární elektroforézu se sulfatovaným cykloextrinem jako chirální selektorem. U neracemických helquatů byly měřeny racemizační bariéry.

Tato práce vznikla za podpory GAČR P207/10/2391, 203/09/1614, 203/09/0705 a ÚOCHB AV ČR v.v.i. (Z4 055 0506).

### LITERATURA

- Adriaenssens L., Severa L., Šalová T., Císařová I., Pohl R., Šaman D., Rocha S.V., Finney N.S., Pospíšil L., Slaviček P., Teplý F.: *Chem. Eur. J.* 15, 1072 (2009).
- Adriaenssens L.; Severa L.; Vávra J.; Šalová T.; Hývl J.; Čížková M.; Pohl R.; Šaman D.; Teplý F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1023 (2009).
- Jacques J., Collet, A., Wilen S. H.: *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, 2nd ed., Krieger, Malabar, Florida, 1994.

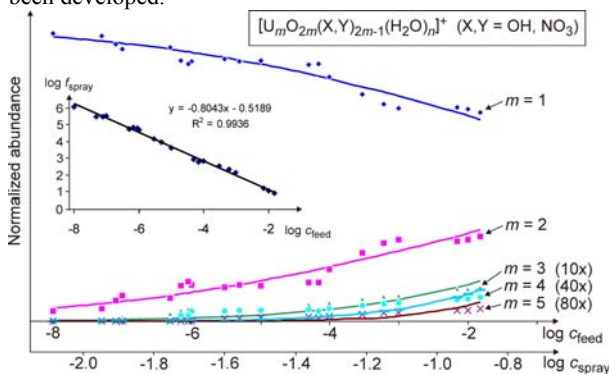
## GAS-PHASE CHEMISTRY AS A MECHANISTIC TOOL FOR SOLUTION CHEMISTRY AND CATALYSIS

DETLEF SCHRÖDER

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic*

Mass spectrometry (MS) has numerous applications ranging from elemental<sup>1</sup> and molecular analysis<sup>2</sup> to various "omics" in biology<sup>3</sup> and applications in medicine<sup>4</sup>. Olympic games, for example, nowadays involve not only sports but a lot of mass spectrometry for advanced doping tests<sup>5</sup>. The success of MS is due to the unique combination of high sensitivity and low sample requirements. Due to its widespread usage, mass spectrometry is continuously growing and offers excellent employment opportunities for qualified researchers.

Most analytical applications of MS evolve as a spin-off of fundamental studies situated at the interplay between physical, organic, and inorganic chemistry. Mass spectrometry, for example, requires the sample to be ionized which in turn leads to the determination of ionization energies and proton affinities. Similarly, the fragmentation of ions provide bond energies for organic, inorganic, and organometallic compounds which allow to understand chemical reactivity and predict particularly reactive species. A key advantage and simultaneously an important drawback is that gas-phase methods determine molecular properties in the absence of any "environment" (e.g. solvents, counter-ions etc.). The measured properties are therefore intrinsic for the species under study. As such they provide profound insight into concepts of chemical bonding and reactivity and allow direct comparison with theory. In turn, however, the intrinsic properties may only poorly correlate with bulk processes in which the environment is an inherent part of chemical reactivity. Consequently, the results obtained in gas-phase measurements need to be "translated" for their use in applied chemistry and several schemes for such conversions have been developed.

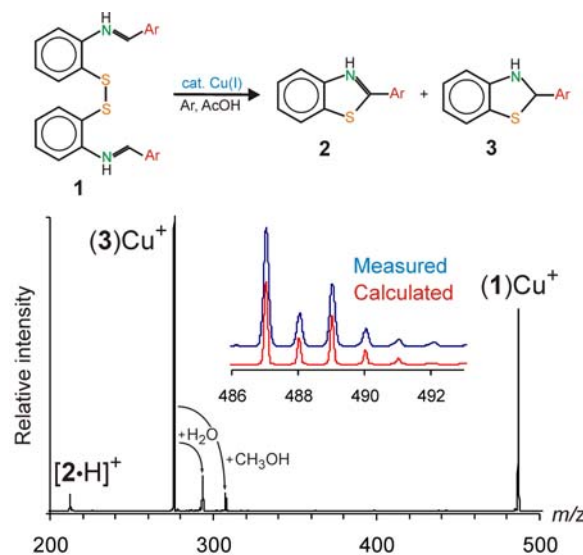


**Figure 1.** Mono- and oligonuclear uranyl cations observed via MS as a function concentration in solution

The first example of such a "translation" concerns solutions of uranyl nitrate in water<sup>6</sup>. While seemingly trivial,

the amount of oligonuclear uranyl species sampled via MS using electrospray ionization (ESI) increases with the concentration of the uranyl salt. For this system, we could establish a quantitative correlation between the gas-phase data and results from solution chemistry (Fig. 1), thereby allowing a direct connection between the situation in the gas phase and in the bulk.

The second example deals with chemical reactivity<sup>7</sup>. Under anaerobic conditions, Cu(I) can bring about a twofold C–S coupling of bisiminodisulfides in almost quantitative yield ( $1 \rightarrow 2 + 3$ ; Fig. 2). ESI of the reaction solution yields an abundant signal of the copper(I) complex ( $1$ )Cu<sup>+</sup>. When this species is mass selected and heated by collisions with helium, it loses the neutral C–S coupling product **2** to afford the second C–S coupling as Cu(I) complex, ( $3$ )Cu<sup>+</sup>. The results demonstrate that the catalytic sequence can occur in the presence of a single copper atom and that no higher-order aggregates are required for a mechanistic rationale.



**Figure 2.** Cu(I)-mediated C–S coupling in solution and in the gas phase. The inset shows the measured and the modeled isotope cluster of the ion ( $1$ )Cu<sup>+</sup>

*This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z40550506) and the European Research Council (AdG HORIZOMS).*

## REFERENCES

1. Becker J. S., Jakubowski N.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 1969 (2009).
2. Gross J. H.: *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2004.
3. James P.: *Quart. Rev. Biophys.* 30, 279 (1997).
4. Spáňel P., Smith D.: *Mass Spectrom. Rev.* 24, 661 (2005).
5. Hemmersbach P.: *J. Mass Spectrom.* 43, 839 (2008).
6. Tšierkezos N. G., Roithová J., Schröder D., Ončák M., Slaviček P.: *Inorg. Chem.* 48, 6287 (2009).
7. Šrogl J., Hyvl J., Révész A., Schröder, D.: *Chem. Commun.* 3463 (2009).



## KOORDINAČNÍ CHEMIE A KATALYTICKÉ VYUŽITÍ HOMOLOGICKÝCH PYRIDYLFOSFINOFERROCENOVÝCH LIGANDŮ

PETR ŠTĚPNIČKA<sup>a,\*</sup>, JIŘÍ SCHULZ<sup>a</sup>, THORSTEN KLEMMANN<sup>b</sup>, ULRICH SIEMELING<sup>b</sup> a IVANA ČÍSAŘOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univerzita Karlova, PŘF, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2; <sup>b</sup>Universität Kassel, Heinrich-Plett-Strasse 40, D-34132 Kassel  
stepnic@natur.cuni.cz, schulz@natur.cuni.cz

Bifunkční  $P^{III},N$ -donorové ligandy patří do skupiny takzvaných hemilabilních donorů<sup>1</sup>. Díky možnosti koordinace k atomu kovu prostřednictvím měkkého ( $P^{III}$ ) i tvrdého (N) donorového atomu a tvorbě nesymetrických chelátových komplexů nalezly tyto látky široké uplatnění v organické katalýze<sup>2,3</sup>. Hemilabilní koordinace jednoho z donorových atomů ligandu umožňuje zároveň uvolnit koordinační místo pro přistupující substrát i stabilizaci katalyzátoru v průběhu katalytického cyklu.

Významnou pozici mezi  $P^{III},N$ -hemilabilními donory zaujímají pyridyl-fosfinové ligandy<sup>4,5</sup>, které se vyznačují zajímavými elektronickými i sterickými vlastnostmi, jež lze cíleně modifikovat změnou povahy substituentů. Pro tento účel může být výhodným substituentem ferrocenové jádro, které vyniká velkou elektronovou bohatostí a dobře definovanou geometrií.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli studovat dva homologické pyridyl-fosfinoferrocenové ligandy **1** (cit.<sup>6</sup>) a **2**, jejich koordinační chemii vůči palladiu a katalytické využití v palladiem katalyzované Suzukiho-Miyaurově reakci a kyanačních reakcích arylbromidů.

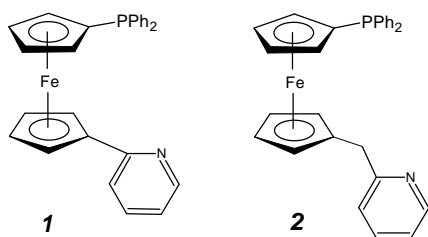


Schéma 1. Připravené pyridyl-fosfinoferrocenové ligandy

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/10/0176.

### LITERATURA

1. Bader A., Lindner E.: *Coord. Chem. Rev.* 108, 27 (1991).
2. Guiry P. J., Saunders C. P.: *Adv. Synth. Catal.* 346, 497 (2004).
3. Maggini S.: *Coord. Chem. Rev.* 253, 1793 (2009).
4. Newkome G.R.: *Chem. Rev.* 93, 2067 (1993).
5. Chelucci G., Orrù G., Pinna G. A.: *Tetrahedron* 59, 9471 (2003).
6. Butler I. R.: *Organometallics* 11, 74 (1992).

## FUNKČNÍ ANALÝZA TEPLOTNĚ ZÁVISLÝCH MUTANTŮ P53

JANA SLOVÁČKOVÁ<sup>a,b</sup>, DIANA GROCHOVÁ<sup>a</sup>, JARMILA NAVRÁTILOVÁ<sup>b</sup>, JAN ŠMARDA<sup>b</sup> a JANA ŠMARDOVÁ<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř molekulární biologie ÚPA FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno; <sup>b</sup>Ústav exp. biologie, Biologická sekce, PŘF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
jana.slovackova@gmail.com

Nádorový supresor p53 hraje důležitou roli v kancerogenezi. V odpovědi na různé stresové signály transkripční faktor p53 kontroluje důležité buněčné funkce tím, že ovlivňuje expresi svých cílových genů. Reguluje apoptózu, buněčný cyklus a genomovou integritu. U nádorů je ztráta funkce p53 velmi často způsobena mutací genu *p53*. Přibližně 10 % mutantů p53 je teplotně závislých, tzn. změnou teploty dochází k obnově jejich funkce. Tyto mutace mohou měnit nejenom celkovou transaktivační schopnost proteinu p53, ale také modifikovat transaktivační schopnost ve vztahu k jednotlivým cílovým genům (tzv. diskriminativní charakter).

Studovali jsme funkční vlastnosti 23 teplotně závislých (td) mutantů p53 (podrobně analyzovaných v kvasinkách<sup>1</sup>) v lidské nádorové linii H1299 odvozené z nemalobuněčného plicního karcinomu. Sledovali jsme transaktivaci několika cílových genů p53 a potvrdili teplotní závislost a výrazný diskriminativní charakter u 20 mutantů, kteří preferenčně transaktivovali *p21* spíše než *bax*. Podle transaktivačních schopností jsme td mutanty p53 rozdělili do 4 funkčních skupin. Obecně lze říct, že celková transaktivační aktivita mutantů nepřevyšuje aktivitu standardní varianty p53, ačkoli míra transaktivace určitých cílových genů u některých mutantů v permissivní teplotě může být výrazně vyšší.

Td mutace p53 jsou snadněji reaktivovatelné než mutace zcela inaktivní<sup>1-3</sup>. Obnovení funkce p53 může být vyvoláno například inhibitorem CDK roskovitinem. Ačkoli mechanismus účinku není zcela znám, pozorovali jsme u některých td mutantů p53 zřetelně zesílenou apoptotickou odpověď po působení roskovitinu jak v permissivní, tak i restriktivní teplotě. Funkční status p53 pravděpodobně ovlivňuje míru odpovědi nádorových buněk na roskovitin, slibnou protinádorovou látku, která v současné době podstupuje druhou fázi klinického testování.

Tato práce vznikla za podpory grantů NS/10448-3 IGA MZ a MŠMT 0021622415.

### LITERATURA:

1. Grochová D., Vaňková J., Damborský J., Ravčuková B., Šmarda J., Vojtěšek B., Šmardová J.: *Oncogene* 27, 1243 (2008).
2. Boeckler F.M., Joerger A.C., Jaggi G., Rutherford T.J., Veprintsev D.B., Fersht A.R.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 10360 (2008).
3. North S., Pluquet O., Maurici D., El-Ghissassi F., Hainaut P.: *Mol. Carcinog.* 33, 181 (2002).

**MATRICE HEMOGLOBINAS KLÍŠTĚČÍHO STŘEVA****DANIEL SOJKA<sup>a</sup>, MARTIN HORN<sup>b</sup>, ZDENĚK FRANTA<sup>a</sup>, HELENA PĚNIČKOVÁ<sup>a</sup>, PETR FRANTA<sup>a</sup>, MICHAEL MAREŠ<sup>b</sup> a PETR KOPÁČEK<sup>a</sup>**<sup>a</sup>Parazitologický ústav BC AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemmingovo náměstí 2, 166 10 Praha sojkadan@gmail.com

Příjem a trávení hostitelské krve je klíčovým dějem v životním cyklu krevsajících parazitů. U klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) se tento děj odehrává ve střevě, které je zároveň primární branou přenosu patogenů. Klíště patří mezi roztoče (Acari) a narozdíl od krevsajícího hmyzu tráví hemoglobin uvnitř buněk střevního epitelu. Hydrolyza není zprostředkována serinovými peptidázami a odehrává se v endo-lysozomech buněk střeva. Kombinací genetického (cDNA, PCR) a biochemického profilingu střevního epitelu sajících samic (specifické inhibitory a substráty, imaging pomocí activity based probes) se nám podařilo demonstrovat, že toto trávení je zprostředkováno maticí peptidas – orthologů enzymatických komplexů popsaných u nematod a platyhelmtů. Tento evolučně konzervovaný komplex zahrnuje cysteinové peptidas papainového typu (cathepsin B, L, C – IrCB1, IrCL1, IrCC1) asparaginylovou endopeptidasu (IrAE1) a aspartovou peptidasu cathepsin D typu (IrCD1). Peptidas jsou exprimovány při sání samic a degradují hemoglobin v kyselém pH. Selektivní inhibitory byly použity k určení rolí individuálních enzymů a společně s hmotnostní spektrometrií k sestavení štěpné mapy hemoglobinu s vyznačením míst štěpení jednotlivých enzymů ve třech časových intervalech. Tři primární endopeptidas IrCD1, IrCL1 a IrAE1 byly exprimovány jako rekombinantní fúzní proteiny. Byly proti nim připraveny protilátky a testovány jejich potenciál jako anti-klíštěcí vakcíny. Aktivní enzymy byly biochemicky charakterizovány a byla studována jejich substrátová specifita pomocí knihoven fluorescenčních substrátů (P1- P4 positional screening library). Pomocí expresních profilů na úrovni mRNA, proteinů i aktivity, imunohistochemie a RNAi je studována jejich funkce *in-vivo* s možností zavést nové nástroje ke kontrole klíšťat a jimi přenášených patogenů.

Tato práce vznikla za podpory grantů IAA600960910 (GA AV), KJB600960911(GAAV) a výzkumného centra LC06009 (MŠMT ČR).

**STREPTAVIDIN - PROTILÁTKA NOVÝ FLEXIBILNÍ ZPŮSOB DOPRAVY ANTIGENŮ NEBO BIOLOGICKY AKTIVNÍCH MOLEKUL****ONDŘEJ STANĚK<sup>a</sup>, HUI DONG<sup>b,c,d</sup>, LALEH MAJLESSI<sup>b,c</sup>, IRENA LINHARTOVÁ<sup>a</sup>, CLAUDE LECLERC<sup>b,c</sup> a PETER ŠEBO<sup>a</sup>**<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, Václavská 1083, 142 20 Praha 4; <sup>b</sup>Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie,<sup>c</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U883, 75724 Paris Cedex 15, France; <sup>d</sup>Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, 225009 Yangzhou, Jiangsu, China

Pro řadu diagnostických a vakcinačních aplikací je důležité dokázat specificky stimulovat imunitní odpověď T lymfocytů proti vybraným antigenům. K tomu je zapotřebí moci dopravovat cíleně příslušné antigeny do endosomu nebo cytosolu profesionálních antigen prezentujících buněk, především dendritických buněk (DB), jež mají aparát pro zpracování antigenů a prezentaci jejich fragmentů na svém buněčném povrchu, v komplexu s MHC glykoproteiny I. a II. třídy.

V této práci jsme vyvinuli nový systém pro dopravu antigenů do dendritických buněk. Je založen na kombinaci směřujících biotinylovaných protilátek, rozeznávajících specifické buněčné receptory a proteinových fúzí antigenů s tetramerním streptavidinem, vázícím s vysokou afinitou biotin.

Na streptavidin byly geneticky připojeny různé antigeny a to jak na N-, tak i na C-konec, případně na oba konce zároveň tak, aby byla zachována schopnost streptavidinu tvořit tetramery. Takto upravené proteiny byly produkovány v bakteriálních buňkách *E. coli* DE3 Artic Express, izolovány z cytosolického extraktu, případně z 2 M močovinného extraktu (precipitát v cytosolu) a tetramerní komplexy byly následně odděleny od monomerů a dalších nečistot pomocí afinitní chromatografie na Iminobiotin agarose.

Pro přímé zacílení antigen presentujících buněk byly použity různé biotinylované protilátky proti povrchovým receptorům, například DEC 205, CD11c a CD 206.

Jako modelový antigen jsme použili kuřecí Ovalbumin, jehož epitopy pro prezentaci na MHC I a MHC II molekulách byly geneticky připojeny na oba konce streptavidinu. Tetramerní komplexy streptavidinu, nesoucí tyto epitopy, byly použity k dopravě antigenu do primárních myších dendritických buněk *in vitro* a *in vivo* buňky pomocí protilátek proti povrchovým receptorům CD11c a CD 206 (manosový receptor). Epitopy byly vystavovány nejen s molekulami MHC II, ale i v komplexu s molekulami MHC I. Již při velmi nízkých koncentracích tetrametru (0,1–1 nM) se projevila výhoda cíleného směřování antigenů. Naše výsledky byly ověřeny na myším modelu s mykobakteriálními antigeny<sup>1</sup>.

Tato práce vznikla za podpory grantů KAN200520702 a NPVII 2B06161

**LITERATURA**

1. Dong H., Stanek O., Langër U., Ung C., Degaiiffier N., Sebo P., Leclerc C., Majlessi L.: EP 09 290 987.8, application filed on December 23, 2009.

## MUTACE NÁDOROVÉHO SUPRESORU P53 JSOU NEGATIVNÍM PROGNOSTICKÝM ZNAKEM U LYMFOMU Z BUNĚK PLÁŠŤOVÉ ZÓNY

LENKA ŠTEFANČÍKOVÁ<sup>a,b</sup>, MOJMÍR MOULIS<sup>a,c</sup>,  
PAVEL FABIAN<sup>d</sup>, BARBORA RAVČUKOVÁ<sup>a</sup>,  
INGRID VÁŠOVÁ<sup>c</sup>, JAN MUŽÍK<sup>f</sup>, JITKA  
MALČÍKOVÁ<sup>e</sup> a JANA ŠMARDOVÁ<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Ústav patologie a <sup>e</sup>Interní hemat. klinika, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav exp. biologie, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>c</sup>LF MU a <sup>f</sup>IBA, Komenského 2, 662 43 Brno, <sup>d</sup>Oddělení patologie, MOÚ, Žlutý kopec 7, 565 53 Brno  
stefancikoval@seznam.cz

Lymfom z buněk pláštěvé zóny (Mantle cell lymphoma, MCL) je vzácným, ale velmi agresivním typem nádorového onemocnění lymfatických uzlin. Pro MCL je charakteristická přítomnost translokace t(11;14)(q13;q32), která způsobuje vysokou expresi cyklinu D1 a tím deregulaci buněčného cyklu. Aktivace cyklinu D, využívaná i diagnosticky, hraje klíčovou roli v rozvoji MCL, ale pro progresi onemocnění jsou nezbytné ještě další aberace<sup>1</sup>. Mezi nimi se jako prognosticky významné ukázaly ty, které pozměňují geny pro regulátory buněčné odpovědi na poškození DNA.

V naší práci jsme se zabývali podrobnou analýzou p53, nádorového supresoru, který hraje důležitou roli při udržování genomové integrity somatických buněk. V reakci na poškození DNA způsobuje, prostřednictvím aktivace cílových genů, zástavu buněčného cyklu, opravy DNA, senescenci či apoptózu.

V souboru 33 pacientů s MCL jsme pomocí funkční analýzy v kvasinkách<sup>2</sup> a následného sekvenování cDNA detekovali 9 mutací genu p53. V osmi případech šlo o jednonukleotidovou záměnu, v jednom o delecii, která způsobila posun čtecího rámce a vytvoření předčasného stop kodonu. Delecii jsme potvrdili také sekvenováním gDNA a zjistili jsme, že vede k degradaci příslušné mRNA. V buňkách s mutací genu p53 dochází obvykle k akumulaci proteinu p53. Tu jsme pomocí westernova přenosu prokázali u všech případů MCL s jednonukleotidovou záměnou v genu p53. Ztrátu lokusu 17p13.3 specifického pro p53 jsme pozorovali s využitím metody FISH u 3 pacientů s mutací p53. Statistickou analýzou jsme prokázali, že přítomnost mutace p53 výrazně zkracuje délku přežívání pacientů s MCL. Ztráta funkce p53 je u MCL nezávislým negativním prognostickým faktorem<sup>3</sup>.

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

### LITERATURA:

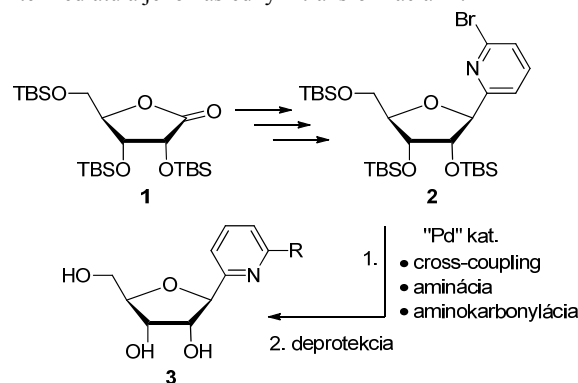
1. Pileri S.A., Falini B.: *Haematologica* 94, 1488 (2009).
2. Flaman J.M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A.P., Limacher J.M., Bron L., Benhattar J., Tada M., Van Meir E.G., Estreicher A., Iggo R.D.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 3963 (1995).
3. Stefancikova L., Moulis M., Fabian P., Ravcukova B., Vasova I., Muzik J., Malcikova J., Falkova I., Slovackova J., Smardova J.: *Int. J. Oncol.* 36, 699 (2010).

## MODULÁRNA SYNTÉZA 6-SUBSTITUOVANÝCH PYRIDÍN-2-YL C-RIBONUKLEOZIDOV

MARTIN ŠTEFKO<sup>a</sup> a MICHAL HOCEK<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Gilead Sciences & UOCHB Výzkumné Centrum, CZ-166 10 Praha 6  
stefko@uochb.cas.cz, hocek@uochb.cas.cz

C-Nukleozidy představují potencionálně zajímavou skupinu látek charakterizovanou nahrazením labilnej C-N vazby, chemicky a enzymaticky stabilnejšou C-C vazbou. Súčasně syntetické prístupy sa vo väčšine prípadov vyznačujú nedostatočnou anomerickou selektivitou, nízkymi výťažkami a nutnosťou optimalizovať syntézu každého nového C-nukleozidu<sup>1</sup>. Z uvedených dôvodov sa v súčasnej dobe zaoberáme vývojom modulárnej syntézy, založenej na príprave multigramového množstva univerzálneho intermediátu a jeho následným transformáciám<sup>2</sup>.



Adícia 6-brómopyridínliťia na TBS-chránený ribonolaktón **1** a následná *in situ* acylácia príslušného hemiketál alkoxidu poskytla acetál, ktorého redukciovou sa získal 6-brómopyridín-2-yl C-ribonukleozid **2** v 63% celkovom výťažku. Tento bol následne podrobený sériam paládium katalyzovaných aminácií, aminokarbonylácií a cross-coupling reakcií, ktoré po štiepení chrániacich funkčných skupín poskytli sériu voľných 1β-(6-alkyl-, 6-aryl-, 6-amino-, 6-karbamoyl- a 6-hetaryl-pyridín)-C-ribonukleozidov **3** (cit.<sup>2e</sup>).

Táto práca je súčasťou výskumného projektu Z4 055 905, podporovaná centrom pre biomolekuly a komplexné molekulárne systémy (LC 512), Grantovou agentúrou AVČR (IAA400550902) a Gilead science, Inc. (Foster City, CA).

### LITERATURA

1. Štambaský J., Hocek M., Kočovský P.: *Chem. Rev.* 109, 6729 (2009).
2. (a) Urban M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M. J. *Org. Chem.* 71, 7322 (2006); (b) Joubert N., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 72, 6797 (2007); (c) Štefko M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1689; (d) Štefko M., Pohl R., Hocek M.: *Tetrahedron* 65, 4471 (2009); (e) Štefko M., Slavětinská L., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 75, 442 (2010).

**STRUKTURA A FUNKCE  
HALOGENALKANDEHALOGENAS  
V ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDLECH**

**VERONIKA ŠTĚPÁNKOVÁ<sup>a</sup>, RADKA  
CHALOUPKOVÁ<sup>a</sup>, MORTEZA KHABIRI<sup>b</sup>, BABAK  
MINOFAR<sup>b</sup>, ZBYNĚK PROKOP<sup>a</sup>, RÜDIGER  
ETTRICH<sup>b</sup> a JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Loschmidtovy laboratoře, Masarykova univerzita, Kamenice  
5/A4, 625 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav systémové biologie a ekologie AV  
ČR, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky  
veronika@chemi.muni.cz

Enzymová katalýza v nekonvenčních solventech, představuje velmi zajímavou oblast enzymologie. Převedení biotransformací z vodného prostředí do organických rozpouštědel přineslo řadu výhod a zvýšilo tak efektivitu využití enzymů v řadě průmyslových aplikací<sup>1</sup>. Přesto je mechanismus působení solventů na funkci enzymů stále málo známý a jejich vliv na aktivitu nelze předem odhadnout.

Cílem našeho projektu je pochopit a vysvětlit chování tří hydrolytických enzymů halogenalkandehalogenas (LinB ze *Sphingobium japonicum* UT26, DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064 a DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110) v prostředí organických rozpouštědel. Získané znalosti jsou důležité pro zvýšení aplikačního potenciálu studovaných enzymů. Testován byl vliv třinácti s vodou mísitelných organických rozpouštědel na aktivitu a stabilitu halogenalkandehalogenas. Přestože jsme studovali příbuzné enzymy, jejich tolerance k organickým rozpouštědlům byla různá. Halogenalkandehalogenasy DhaA a DbjA vykazovaly funkční stabilitu vůči většině testovaných rozpouštědel. V případě DbjA byl dokonce s několika substráty detegován nárůst aktivity. Naopak u LinB byla pozorována převážně inaktivace. V návaznosti na aktivitní měření byla provedena strukturální charakterizace enzymů v koncentracích organických rozpouštědel způsobujících úplnou inhibici. Použity byly metody cirkulárního dichroismu a fluorescenční spektroskopie. V několika případech zůstala struktura enzymů nezměněna, přestože byla v dané koncentraci solventu pozorována ztráta funkce.

Pro studium vlivu rozpouštědel na enzymy na atomární úrovni jsme použili molekulárně dynamické simulace ukazující změny ve struktuře enzymů a jejich interakce s molekulami solventu. Modelování odhalilo přímou souvislost mezi snahou molekul rozpouštědla penetrovat do aktivního místa s jeho inhibičním účinkem. Zatímco větší počet molekul v aktivním místě vedlo k inhibici, přítomnost jedné izolované molekuly pravděpodobně enzym aktivizuje. Tento předpoklad bude ověřen inhibičním kinetickým měřením v přítomnosti vybraných organických solventů.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů GA ČR 203/08/0114, GA AV IAA401630901 a GA MŠMT LC06010 a MSM0021622412.

**LITERATURA**

1. Klibanov A. M.: *Nature* 409, 241 (2001).

**VÝPOČETNÍ STUDIE CUCURBIT[N]JURILŮ  
A KOMPLEXŮ PSEUDOROTAXANŮ**

**ZORA STŘELCOVÁ<sup>a</sup>, PETR KULHÁNEK<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR ŠINDELÁŘ<sup>b</sup> a JAROSLAV KOČA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Národní centrum pro výzkum biomolekul; <sup>b</sup>Ústav chemie  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2,  
612 35 Brno  
stre@chemi.muni.cz

Výzkum v oblasti nanomolekul, jejich využití v lékařství, průmyslu i chemické výrobě patří k předním chemickým oborům současnosti. Ve své práci jsme se zaměřili na studium homologní řady cucurbit[n]jurilů ( $n=5-10$ ). Jedná se o makrocyclické sloučeniny, schopné komplexovat ionty, malé organické molekuly i polypeptidy. Takto vzniklé komplexy, v nichž je lineární molekula provléknuta přes makrocycklus a celá struktura je termodynamicky stabilní, se nazývají pseudorotaxany.

Naše studie nabízí komplexní pohled na dynamické strukturální a vazebné vlastnosti cucurbit[n]jurilů. Do výpočetně-chemických simulací byl zahrnut i cucurbit[9]juril, jenž zatím nebyl izolován. V analýze získaných molekulově dynamických simulací jsme se zaměřili na strukturální vlastnosti - deformace cyklu v závislosti na počtu jednotek - a jeho flexibilitu. Pokročilé analýzy pak umožnily popis chování rozpouštědla v okolí cucurbit[n]jurilu. S využitím metod potenciálu střední síly, umožňující výpočet volné energie, jsme dále vyhodnotili energetické bariéry pro pohyb molekul vody v kavitě cucurbit[n]jurilu.

Získané výsledky byly dále použity při popisu vlastností pseudorotaxanů založených na cucurbit[n]jurilu a derivátech 4,4'-bipyridinu. V rámci experimentálních studií, bylo prokázáno, že takovéto komplexy, v nichž lineární molekula obsahuje dvě terminální COOH skupiny, prokazují různé konformační chování v závislosti na pH. Cyklická molekula se tak pohybuje kolem molekuly lineární a v důsledku toho lze tyto sloučeniny považovat za supramolekulární přepínače<sup>1,2</sup>. Ve své práci jsme rozšířili experimentální studie o vyhodnocení profilů volných energií zmíněných intermolekulárních posunů a umožnili přesnější popis celého procesu na atomové úrovni.

Práce byla podpořena následujícími granty: MŠMT LC06030, MSM0021622413, GAČR: 301/09/H004.

**LITERATURA:**

1. Sindelar V., Silvi S., Kaifer A. E.: *Chem. Commun.* 2006, 2185.
2. Sindelar V., Silvi S., Parker S. E., Sobransingh D., Kaifer A. E.: *Adv. Funct. Mater.* 17, 694 (2007).

## NOVÝ MAKROCYKLUS PRO SELEKTIVNÍ VÁZÁNÍ ANIONTŮ

JAN ŠVEC a VLADIMÍR ŠINDELÁŘ\*

Ústav chemie, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
sindelar@chemi.muni.cz

Glykoluril je molekula používaná pro přípravu molekulárních klips a makrocyclických sloučenin<sup>1,2</sup>. Hlavní pozornost je věnována makrocyclické sloučenině cucurbit[n]urilu připravené reakcí glykolurilu s formaldehydem. Cucurbit[n]uril váže interně i externě kationy<sup>3</sup>. Značné omezení při použití cucurbit[n]urilu však představuje jeho nerozpustnost v organických rozpouštědlech a pouze omezená rozpustnost ve vodném prostředí<sup>4</sup>. V naší práci představujeme syntézu a supramolekulární vlastnosti nového makrocyklu, který byl připraven z modifikovaného glykolurilu reakcí s formaldehydem. Na rozdíl od cucurbit[6]urilu má námi připravený makrocyklus výrazně větší objem kavity, má méně rigidní strukturu a je velice dobře rozpustný ve vybraných organických rozpouštědlech. Parciální kladný náboj v centrální části vnitřní kavity makrocyklu umožňuje interní vázání aniontů. Halogenidy jsou v makrocyklu vázány se stoupající afinitou v pořadí  $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$ . Vzhledem k těmto vlastnostem je nový makrocyklus testován pro řadu potencionálních aplikací.

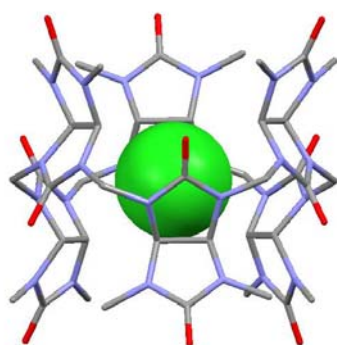


Schéma 1. Nový makrocyklus s interně vázaným  $Cl^-$

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/10/0695.

### LITERATURA

- Rowan A., Elemans J., Nolte R.: *Acc. Chem. Res.* 32, 995 (1999).
- Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., Isaacs L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4844 (2005).
- Liu S., Ruspic Ch., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., Zavalij P. Y., Isaacs L.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15959 (2005).
- Lee J. W., Samal S., Selvapalam N., Kim H. J., Kim K.: *Acc. Chem. Res.* 36, 621 (2003).

## APLIKACE FOSFINOFERROCENOVÝCH AMIDŮ ODVOZENÝCH OD AMINOKYSELIN JAKO LIGANDŮ V ENANTIOSELEKTIVNÍ KONJUGOVANÉ ADICI

JIŘÍ TAUCHMAN a PETR ŠTĚPNIČKA

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

Organokovové sloučeniny se staly základními materiály moderní organické syntézy a dnes si jen těžko můžeme představit některou totální syntézu bez klíčového kroku zahrnujícího nukleofilní organokovové činidlo. Mezi nejrozšířenější syntetické metody pro tvorbu C–C vazby patří mědi katalyzovaná konjugovaná adice organokovových látek na  $\alpha,\beta$ -nenasycené karbonylové sloučeniny<sup>1,2</sup>. Použití chirálního komplexu mědi za využití především organozinečnatých nebo Grignardových činidel umožňuje provést katalytickou enantioselektivní verzi této reakce.

Nové chirální fosfinoferrocenové amidy nesoucí aminokyselinové pendantní skupiny prezentované v této práci (schéma 1) navazují na předchozí úspěšné využití podobných ligandů v katalýze a koordinační chemii<sup>3-5</sup>. Porovnání strukturálních a katalytických vlastností takových hybridních ligandů umožní zhodnotit vliv jednotlivých molekulárních částí na průběh katalytických reakcí.

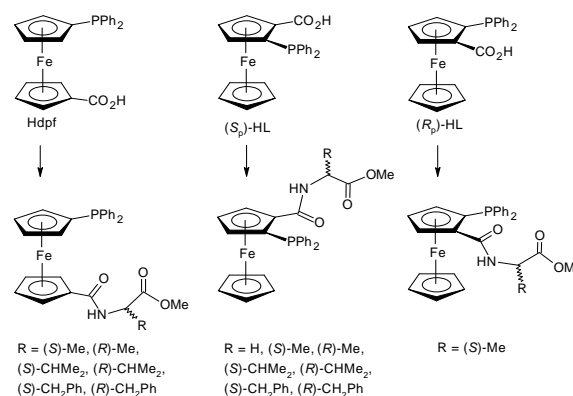


Schéma 1.

Tato práce vznikla za podpory GA UK (projekt č. 58009) a grantu MŠMT ČR LC06070.

### LITERATURA

- Harutyunyan S. R., den Hartog T., Geurts K., Minnaard A. J., Feringa B. L.: *Chem. Rev.* 108, 2824 (2008).
- Jerphagnon T., Pizzuti M. G., Minnaard A. J., Feringa B. L.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 1039 (2009).
- Lamač M., Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Organometallics* 26, 5042 (2007).
- Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: *New J. Chem.* 33, 1549 (2009).
- Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Organometallics* 28, 3288 (2009).

## ANALÝZA SEKVENČNÍCH ZMĚN V LDLR GENU: OD MUTACÍ K ROZSÁHLÝM PŘESTAVBÁM A ZPĚT

**LUKÁŠ TICHÝ, LUCIE DUŠKOVÁ, PETRA ZAPLETALOVÁ, LENKA KOPEČKOVÁ, ONDŘEJ LETOCHA a LENKA FAJKUSOVÁ**

*Fakultní nemocnice Brno, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Černopolní 9, 613 00 Brno  
ltichy@fnbrno*

Mutace a přestavby v genu pro LDL receptor (*LDLR*) jsou příčinou familiární hypercholesterolemie (FH). FH je autosomálně dominantní dědičné onemocnění charakterizované izolovaným zvýšením LDL cholesterolu v krvi pacientů. Dlouhodobě zvýšená hladina LDL cholesterolu v krvi je stěžejním krokem v patofyziologických mechanismech vedoucích k ateroskleróze. Frekvence heterozygotů je 1/500, frekvence homozygotů nebo složených heterozygotů je udávána 1/1000000.

Gen pro LDL receptor je složen z 18 exonů rozložených do 45 kb (chrom. 19p13 (cit.<sup>1</sup>), mRNA 5,3 kb (cit.<sup>2</sup>)). Do dnešního dne je popsáno více jak 1000 sekvenčních variant<sup>3</sup> tohoto genu.

V rámci projektu MEDPED<sup>4</sup> se výraznou měrou podílíme na vyhledávání pacientů, s mutací v genu *LDLR*. Celkem bylo v naší populaci nalezeno 75 typů kauzálních sekvenčních změn (z toho 18 dosud ve světě nepopsaných) a 9 typů rozsáhlých intragenových přestaveb. U jednotlivých intragenových přestaveb byly detailně charakterizovány body zlomu a stanoven mechanismus jejich vzniku. V souboru našich pacientů byly jako mechanismy vzniku rozsáhlých delecí/duplikací identifikovány nealelická homologní rekombinace a nehomologní spojování konců. Druhý jmenovaný mechanismus nebyl u genu *LDLR* popsán. Celkově bylo dosud analyzováno 1172 probandů, přičemž u 453 byla nalezena kauzální sekvenční změna, u 719 pacientů nalezena nebyla.

V minulých letech byla DNA analýza genu *LDLR* založena na přímé sekvenční analýze jednotlivých exonů. Tímto metodickým přístupem byly detegovány jednonukleotidové záměny, malé delece, inserce a duplikace. Pro analýzu rozsáhlých přestaveb byla zavedena metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Vzhledem k velkému množství analýz byla v roce 2009 molekulárně genetická analýza genu *LDLR* modifikována a ve spolupráci se společností Asper Biotech Ltd. byl vyvinut čip založený na technologii APEX (Arrayed Primer Extension). Tento čip umožňuje detekci 75 mutací v genu *LDLR* vyskytujících se v české populaci a 75 mutací vyskytujících se s větší frekvencí v dalších světových populacích.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT LC06023 a 2B08060.*

## LITERATURA

1. Südhof T. C., Goldstein J. L., Brown M. S., Russell D. W.: *Science* 228, 815 (1985).
2. Yamamoto T., Davis C. G., Brown M. S., Schneider W. J., Casey M. L., Goldstein J. L., Russell D. W.: *Cell* 39, 27 (1984).
3. Fokkema I. F. A. C., Den Dunnen J. T., Taschner P. E. M.: *Hum Mutat.* 26, 63 (2005).
4. <http://www.athero.cz/projekt-medped/projekt-medped.html>, staženo 29.1.2010.

## NOVÁ DIASTEREOSELEKTIVNÁ SYNTÉZA FENYLINDOLIZIDINOLŮV

**EVA TÓTHOVÁ\*, ŠTEFAN MARCHALÍN, PETER ŠAFAŘ a JOZEFÍNA ŽÚŽIOVÁ**

*Oddelenie organickej chémie, Ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie, FCHPT, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko  
euka.tothova@gmail.com*

Indolizidínový skelet je súčasťou veľkého počtu prírodných zlúčenín, nachádzajúcich sa v rastlinnej a živočíšnej ríši, vykazujúcich široké spektrum biologickej aktivity. Medzi uvedenými zlúčeninami najvýznamnejšiu skupinu predstavujú polyhydroxyindolizidíny, z ktorých niektoré sú veľmi účinnými inhibítormi bunkových glykozidáz<sup>1</sup>. Z prírodných polyhydroxyindolizidínových alkaloidov patria medzi najznámejšie kastanospermín, swainsonín a lentiginozín. Z uvedených zlúčenín je swainsonín prvým inhibítorm glykoproteínového typu úspešne vyselektovaným ako potenciálny liek proti rakovine. Nepriaznivý vplyv na centrálnu nervovú sústavu a vysoké náklady na jeho syntézu však v súčasnosti obmedzujú jeho praktické využitie<sup>2,3</sup>. Pozornosť sa preto sústreďuje na analógy týchto alkaloidov s ekonomicky výhodnou syntézou a zároveň bez vedľajších účinkov.

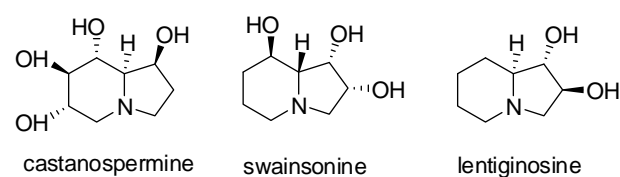


Schéma 1. Prírodné polyhydroxylované indolizidíny

Pretože štúdium vzťahu medzi štruktúrou a biologickou aktivitou nie je u vyššie spomenutých prírodných látok ukončené, syntéza nových analógov týchto zlúčenín stereodivergentnými metódami zostáva aktuálnou výzvou pre organických chemikov. Biologická aktivita týchto derivátov sa výraznejšie mení prevažne v závislosti od počtu, polohy a stereochemie hydroxylových skupín na indolizidínovom skelete.

Náš syntetický prístup k substituovaným indolizidínolom využíva internú asymetrickú indukciu, pričom chiralita sa v molekule indolizínu derivuje z vhodne

zabudovaného stereogénneho centra z aminokyseliny. Kľúčovým krokom v syntéze cieľových zlúčenín-7-fenyлиндolizidín-8-olov je tandém diastereoselektívnych redukcii benzotieno[2,3-*f*]indolizindiónu: karbonylovej skupiny a tiofénového jadra<sup>4,5</sup>.

Podarilo sa nám pripraviť analóg tyloforínu v 6-tich krokoch s dobrým celkovým výťažkom (20 %) z lacnej a ľahko dostupnej L-glutámovej kyseliny a benzotiofén-2-karbaldehydu.

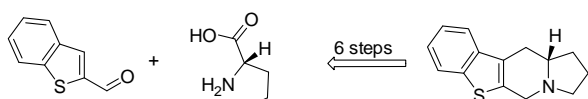


Schéma 2. Nový analóg tyloforínu

Originálna stratégia, založená na desulfurizačnom procese benzotiofénového kruhu ako kľúčového kroku, poskytuje jedinečnú cestu k zavedeniu fenylovej skupiny na indolizínový skelet. Zároveň sa pravdepodobne jedná o najpriamočiarejšiu metódu pre syntézu 7-substituovaných indolizidínolov, ktorá umožňuje efektívny dizajn nových substituovaných indolizidínov. V prvom kroku pravdepodobne dochádza k *cis*-adícii atómov vodíka na dvojité väzbu tiofenu. Zo sterických dôvodov je preferovaná adícia z konvexnej strany molekuly. V prípade *trans*-alkoholu však hydroxy skupina smerujúca na *exo*-stranu molekuly čiastočne bráni prístupu z tejto strany, v dôsledku čoho sa výrazne znižuje selektivita reakcie v porovnaní s *cis*-alkoholom. V ďalšom kroku prebieha redukcia karbonylovej skupiny na hydroxy skupinu.

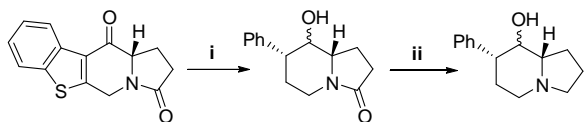


Schéma 3. Nové fenyлиндolizidíny: (i) NaBH<sub>4</sub> resp. L-Selectride, (ii) LAH

Všetky tieto deriváty si zaslúžia širšiu pozornosť, pretože predstavujú potenciálne biologicky aktívne látky, ktoré patria do skupiny prírodných alkaloidov. Zosyntetizované zlúčeniny sa podrobili antimikrobiálnym testom na vybraných druhoch mikroorganizmov. Zistilo sa, že antimikrobiálna aktivita pripravených indolizínových derivátov sa výrazne mení v závislosti od počtu, polohy a stereochemie substituentov na indolizidínovom skelete.

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0210-07 a VEGA MŠ SR 1/0161/08.

#### LITERATÚRA

1. Winchester B. G.: *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 645 (2009).
2. El Nemr A. E.: *Tetrahedron* 56, 8579 (2000).
3. Pyne S. G.: *Curr. Org. Synth.* 2, 39 (2005).
4. Marchalín Š., Žúziová J., Kadlečíková K., Šafář P., Baran P., Dalla V., Daich A.: *Tetrahedron Lett.* 48, 697 (2007).

5. Šafář P., Žúziová J., Marchalín Š., Tóthová E., Prónayová N., Švorc L., Vrabel V., Daich A.: *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 626 (2009).

#### PRODUKCE FEROMONU A JEHO PERCEPCIE U *Anastrephy fraterculus*

LUCIE VANÍČKOVÁ<sup>a,b</sup>, BLANKA KALINOVÁ<sup>a</sup>,  
RUTH R. DO NASCIMENTO<sup>c</sup>, RADKA BŘÍZOVÁ<sup>b</sup>  
a MICHAL HOSKOVEC<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Infochemikálie, ÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; <sup>c</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, BR 104 Norte Km 14, 57072-970, Maceió – AL, Brazílie  
vanickova@uochb.cas.cz

*Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) je jedním z nejvýznamnějších tropických a subtropických škůdců ovocných plodů, podílející se každoročně na rozsáhlých škodách ve světovém zemědělství. Tyto jihoamerické mouchy z čeledi vrtulovitých mají velice složité předkopulační chování, kde významnou roli hrají samci produkované vizuální, chemické a akustické signály. Námluvy zahrnují různé typy pohybů těla, nohou a křídel. Samci se schromažďují v rojích na hostitelských stromech a chovají se teritoriálně. Lákaají samičky vícesložkovým těkavým feromonem. Feromon je produkován slinnými i rektálními žlázami a je posléze uvolňován ústním a řitním otvorem<sup>1</sup>. Předchozími analýzami feromonu byly identifikovány dva monoterpeny limonen a β-ocimen, tři izomery seskviterpenu α-farnesenu, seskviterpeny β-bisabolena a α-bergamotenu, kyselina benzoová, nonanal, C<sub>9</sub>-alkoholy, laktony anastrephin, epianastrephin a suspensolid, a čtyři alkyl pyraziny<sup>2,3</sup>.

Naše studie prezentuje analýzu těkavých složek feromonu, pohlavně specifické rozdíly v percepci feromonu a produkci feromonu v závislosti na stáří a cirkadiálním rytmu.

Sexuálně zralí samci laboratorní kolonie *Anastrephy fraterculus* (poskytnuté laboratorní FAO/IAEA, Seiberdorff, Rakousko) byli použiti pro sběr těkavých složek feromonu. Látky byly zachyceny na sorbentu SuperQ, následně vymyty hexanem a analyzovány za použití plynové chromatografie ve spojení s elektroantenografickou detekcí (GC-EAD; kolony WAX a DB-1) a dvourozměrné plynové chromatografie s TOF hmotnostně-spektrometrickou detekcí (GC×GC-TOFMS). Identifikovali jsme u samců i samic šest antenálně aktivních (tj. na tykadlech) sloučenin, jmenovitě (*Z*)-3-nonenol, (*Z,Z*)-3,6-nonadien-1-ol, geranylaceton, (*E,E*)-α-farnesen, suspensolid a epianastrephin. Pozorovali jsme pohlavně specifické rozdíly v percepci feromonu, samice byly více senzitivní k C<sub>9</sub>-alkoholům než samci, citlivost na ostatní antenálně aktivní složky feromonu byla u obou pohlaví srovnatelná. Závislost produkce feromonu na stáří a cirkadiálním rytmu je nyní analyzována.

Naše data prokázala, že obě pohlaví jsou senzitivní k samčímu feromonu, ale samice jsou více senzitivní k (*Z*)-3-nonenolu a (*Z,Z*)-3,6-nonadien-1-olu. To naznačuje, že látky, vnímané stejně oběma pohlavími pravděpodobně mají



agregační funkci, zatímco látky vnímané rozdílně zprostředkují sexuální komunikaci.

Tato práce vznikla za podpory grantu Z405595.

#### LITERATURA

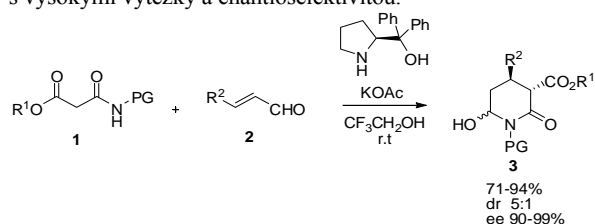
1. Claude W. T.: *J. Insect Physiol.* 53, 1087 (2003).
2. Cáceres C., Segura D. F., Vera M. T., Wornoyaporn V., Cladera J. L., Teal P.; Sapountzis P.; Bourtzis K., Zacharopoulou A., Robinson A. S.: *Bio. J. Lin. Soc.* 97, 152 (2009).
3. Lima I. S., House P. E., R. do Nascimento R.: *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 196 (2001).

### ENANTIOSELEKTIVNÍ PŘÍPRAVA PIPERIDIN-2-ONŮ POMOCÍ ORGANOKATALÝZY

JIŘÍ SCHIMER a JAN VESELÝ\*

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2 jxvesely@natur.cuni.cz*

Výzkum nových efektivních reakcí, které umožňují přípravu komplexních molekul ze snadno dostupných výchozích látek je i nadále cílem řady vědeckých pracovišť. Ačkoli je odvětví organické syntézy zvané *organokatalýza* stále ještě ne plně rozvinuté, byly do současnosti publikovány tisíce organokatalytických reakcí<sup>1-4</sup>. Řada z nich se zabývá syntézou cyklických sloučenin obsahujících pouze uhlíkatý skelet či heterocyklických sloučenin obsahujících atomy N, O a S. Nicméně pouze malá pozornost byla věnována přípravě derivátů piperidin-2-onů, které slouží jako běžně používané prekurzory pro syntézu biologicky aktivních látek (polycyklické alkaloidy jako indol[2,3-a]chinolizidiny a benz[*a*]chinolizidiny). S ohledem na odbornou literaturu se naše skupina zaměřila na přípravu enantiomerně čistých derivátů piperidin-2-onů<sup>5</sup>. Jak je naznačeno na schématu příslušné deriváty **3** byly připraveny v jednom reakčním kroku s vysokými výtěžky a enantioselektivitou.



Jako příklad aplikace této nové metodiky bude v příspěvku diskutována asymetrickou syntéza antidepresiva (-)-Paroxetin.

Tato práce vznikla za podpory grantů MSM0021620857, GAČR (203/09/P193).

#### LITERATURA

1. Tietze L. F.: *Chem. Rev.* 1996, 115.
2. Wasilke J. C., Obrey S. J., Baker, R. T., Bazan, G. C.: *Chem. Rev.* 2005, 1001.

3. Berkessel R., Groger H.: *Asymmetric Organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
4. List B.: *Chem. Rev.* 2007, 5413.
5. Valero G., Schimer J., Císařová I., Veselý J., Moyano A., Rios R.: *Tetrahedron Lett.* 2009, 1943-1946.

### EFEKT INHIBITORŮ HISTONOVÝCH DEACETYLAS NA ACETYLACI HISTONŮ, METHYLACI DNA A EXPRESI GENU SMN

EVA ZAPLETALOVÁ<sup>a,b</sup>, KRISTÝNA STEHLÍKOVÁ<sup>a</sup>, MARIAN HLAVNÁ<sup>a</sup> a LENKA FAJKUSOVÁ<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno; <sup>b</sup>Ústav experimentální biologie, PřF MU Brno, Kamenice5, 625 00 Brno  
ezapletalova@fnbrno.cz

Spinální svalová atrofie (SMA) je letální autozomálně recesivní neurodegenerativní onemocnění s incidencí cca. 1:5600. Onemocnění je způsobeno defektem v genu *Survival of motor neuron 1 (SMN1)*. Kopie genu *SMN1*, gen *SMN2*, se od *SMN1* liší pouze v 5 jednonukleotidových záměnách. Z genu *SMN2* vzniká pouze asi 10 % funkční mRNA a v závislosti na počtu kopií v genomu působí *SMN2* jako faktor modifikující fenotyp SMA.

V současné době byl prokázán pozitivní efekt léčby SMA pomocí inhibitorů histonových deacetylaz (HDACi). Tyto látky mohou upravit expresi genu *SMN2* ve prospěch většího množství funkčního proteinu SMN. Cílem naší studie bylo analyzovat mechanismy účinku těchto léků pomocí i) studia změn metylačního stavu DNA v promotorové oblasti genu *SMN2*; ii) studia změn acetylace histonů v promotorové oblasti genu *SMN2* a iii) studia změn exprese genu *SMN2* na úrovni mRNA a proteinu po působení inhibitorů histonových deacetylaz (VPA a M344).

U fibroblastových tkáňových linií odvozených od pacientů s SMA bylo po působení VPA a M344 zaznamenáno zvýšení acetylace histonů v promotorové oblasti genu *SMN* průměrně šestinásobně v oblasti okolo 1 kB proti směru transkripce a přibližně dvojnásobně v oblasti okolo 100 pb proti směru transkripce. Po působení HDACi došlo ke snížení metylace promotoru genu *SMN2* přibližně o 6 %. Signifikantní zvýšení exprese genu *SMN2* na úrovni mRNA ani na úrovni proteinu nebylo zaznamenáno.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR LC06023 a MSM0021622415.

#### LITERATURA

1. Kernochan L.E., Russo M.L., Woodling N.S., Huynh T.N., Avila A.M., Fischbeck K.H., Sumner C.J.: *Hum. Mol. Genet.* 14, 1171 (2005).
2. Riessland M., Brichta L., Hahnen E., Wirth B.: *Hum. Genet.* 120, 101(2006).
3. Hauke J., Riessland M., Lunke S., Eyüpoglu I.Y., Blümcke I., El-Osta A., Wirth B., Hahnen E.: *Hum. Mol. Genet.* 18, 2 (2009).

## CHARAKTERIZACE VÝPOTKŮ Z ASEPTICKY SELHÁVAJÍCÍCH TOTÁLNÍCH ENDOPROTÉZ KYČLÍ/KOLEN A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ OSTEOLASTY

**ADÉLA ZDAŘILOVÁ<sup>a\*</sup>, ALENA RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ<sup>a</sup>, JITKA ULRICHOVÁ<sup>a</sup> a JIŘÍ GALLO<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc; <sup>b</sup> Ortopedická klinika, FN Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc  
alfa.baba@seznam.cz

Totální endoprotéza (TEP) kolenního/kyčelního kloubu je jednou z nejspěšnějších a neúčinnějších metod k léčbě pokročilých stádií osteoartrózy kloubů. Nejčastějším důvodem selhávání TEP je aseptické uvolnění a periprotetická osteolýza. Oba dva případy souvisí s uvolňováním polyethylenových (PE) částic z implantátu<sup>1</sup>. Otěrem vzniklé PE částice jsou fagocytovány okolními buňkami např. makrofágy, fibroblasty, osteoblasty, které poté produkují řadu signálních molekul vedoucích k akumulaci prekurzorů osteoklastů a jejich dozrávání na rozhraní kosti a implantátu. Působení signálních molekul je komplexní, protože současně inhibují indukci, dozrávání a funkci osteoblastů. PE částice zároveň stimulují pseudosynoviální buňky ke zvýšené sekreci výpotku, který roznáší po kloubu PE částice, signální molekuly a proteiny, které se podílí na resorpci kosti. Resorpce kosti v oblasti fixačního rozhraní endoprotézy vede až k aseptickému uvolnění implantátu.

Cílem studie bylo stanovit hladiny vybraných markerů zánětu ve výpotcích odebraných pacientům se selhávající TEP kolen/kyčlí, resp. stanovit vliv těchto výpotků na viabilitu lidských osteoblastů (SaOS-2).

Pacienti byli rozděleni do 4 skupin: I) bez TEP a bez artrózy ( $n=2$ ); II) bez TEP s artrózou ( $n=6$ ); III) s funkčními TEP a minimální osteolýzou ( $n=8$ ) a IV) se selhávajícími TEP a osteolýzou ( $n=36$ ).

Hypotéza: Předpokládali jsme, že kloubní výpotky pacientů skupiny IV budou obsahovat vyšší koncentrace mediátorů zánětu (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), vyšší hladiny RANKL a nižší hladiny antiosteoklastických molekul (OPG) a budou vykazovat vyšší toxicitu vůči SaSO-2 v porovnání s výpotky z ostatních skupin.

Výsledky: Dle očekávání byla naměřena vyšší hladina OPG ve skupině III ve srovnání se skupinou IV a nižší hladina RANKL ve skupině IV ve srovnání se skupinou III. Naproti tomu největší množství IL-6 bylo ve skupině II nikoli ve skupině IV. Hladiny prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  byly stanoveny pouze ve skupině IV; u ostatních skupin byly hodnoty pod limitem detekce. Většina výpotků ze skupiny IV snižovala viabilitu SaSO-2, ale tento účinek nebyl signifikantní v porovnání s výpotky z ostatních skupin.

Výsledky studie nepoukazují na větší toxické působení výpotků ze selhávajících kloubů na kultury lidských osteoblastů.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠM 6198959216.



**SIGMA-ALDRICH**

## REJSTŘÍK AUTORŮ

Adriaenssens, Louis	381	Koledová, Zuzana	371
Aimová, Dagmar	376	Kollár, Peter	367
Antolík, Emília	363	Komárek, Jan	368
Arlt, Volker M.	374, 376	Konvičková, Jitka	366
Babušíková, Eva	371	Kopáček, Petr	366, 384
Baranovičová, Lenka	363	Kopečková, Lenka	388
Bartoš, Milan	367	Kořený, Luděk	372
Béres, Tibor	373	Kostlánová, Nikola	368
Bhide, Mangesh	377	Koszttyu, Petr	372
Bornscheuer, Uwe T.	373	Kotora, Martin	367, 380
Brůčková, Lenka	364	Kotrbová, Věra	376
Brzozowski, Marek A.	363	Koudeláková, Táňa	373
Břizová, Radka	389	Koval, Dušan	381
Budka, Jan	374	Kowalska, Marta	373
Calábková, Lenka	364, 371	Krämer, Alwin	371
Cetkovská, Kateřina	365, 366	Kroupa, Jan	374
Cioci, Gianluca	368	Kryštof, Vladimír	371
Císařová, Ivana	383	Kučerová, Jana	378
Damborský, Jiří	369, 373, 376, 386	Kuglík, Petr	376
Dědourková, Tereza	365	Kulhánek, Petr	386
Divoký, Vladimír	364, 371, 378	Kundrát, Ondřej	374
Do Nascimento, Ruth R.	389	Leclerc, Claude	384
Dodson, Guy G.	363	Letocha, Ondřej	388
Doležel, Petr	372	Levová, Kateřina	374
Doleželová, Pavlína	366	Lhoták, Pavel	374
Dong, Hui	384	Linhartová, Irena	384
Dušková, Lucie	388	Luc, Milan	375
Eigner, Václav	374	Luhová, Lenka	379
Ettrich, Rüdiger	386	Macíčková-Cahová, Hana	375
Faber, Edgar	364	Majlessi, Laleh	384
Fabian, Pavel	385	Malčíková, Jitka	376, 385
Fajkusová, Lenka	388, 390	Mareš, Michael	366, 384
Franta, Petr	384	Marchalín, Štefan	388
Franta, Zdeněk	366, 384	Masár, Marián	375
Frébort, Ivo	373	Matulková, Zuzana	378
Frei, Eva	374, 376	Matůšková, Miroslava	363
Gallo, Jiří	391	Mayer, Jiří	376
Galuszka, Petr	373	Mieslerová, Barbora	379
Grochová, Diana	383	Míkula Jr., Ivan	377
Grubhoff, Libor	369	Míkula Sr., Ivan	377
Hatok, Jozef	371	Mínofar, Babak	386
Hessler, Filip	367	Míšek, Jiří	381
Himl, Michal	374	Mlejnek, Petr	372
Hlavna, Marian	390	Mojzík, Renáta	364
Hocek, Michal	375, 385	Mokrý, Jaroslav	364
Holý, Antonín	370	Moos, Jiří	364
Honziček, Jan	365	Moosová, Martina	364
Horn, Martin	366, 384	Moserová, Michaela	376
Hoskovec, Michal	389	Moulis, Mojmír	385
Hošek, Jan	367	Mucha, Rastislav	377
Houser, Josef	368	Müller, Petr	379
Hozák, Pavel	368	Mužik, Jan	385
Chaloupková, Radka	373, 386	Navrátilová, Jarmila	383
Chovancová, Eva	369	Nosek, Jozef	370
Chrudimská, Tereza	369	Oborník, Miroslav	372
Imberty, Anne	368	Otáhalová, Eva	377
Jakůbková, Michaela	370	Palíková, Irena	378
Jančařík, Andrej	370	Pavelka, Antonín	369
Jansa, Petr	371	Pavelková, Jana	364
Jindřich, Jindřich	380	Pavlová, Martina	373
Jiráček, Jiří	363	Pěničková, Helena	366, 384
Jureček, Jana	371	Petrivalský, Marek	379
Kalinová, Blanka	389	Piterková, Jana	379
Kaniansky, Dušan	375	Piterková, Lucie	378
Kapránová, Simona	378	Pojarová, Michaela	374
Kašička, Václav	381	Pospišilová, Šárka	376
Khabiri, Morteza	386	Prchal, Josef T.	377
Kišová-Vargová, Lucia	377	Prokop, Zbyněk	386
Klemann, Thorsten	383	Račay, Peter	371
Koča, Jaroslav	386	Rajnochová Svobodová, Alena	391

Rašková Kafková, Leona	371
Ravčuková, Barbora	385
Rohel, Jan	378
Růčková, Eva	379
Rudenko, Nataliia	369
Řezanka, Michal	380
Řežábek, Karel	364
Severa, Lukáš	381
Schimer, Jiří	390
Schmeiser, Heinz H.	374
Schröder, Detlef	382
Schulz, Jiří	383
Siemeling, Ulrich	383
Slováčková, Jana	383
Sobotka, Roman	372
Sojka, Daniel	366, 384
Soukup, Tomáš	364
Staněk, Ondřej	384
Stará, Irena G.	370, 381
Stary, Ivo	370, 381
Stehliková, Kristýna	390
Stiborová, Marie	374, 376
Štělcová, Zora	386
Šafař, Peter	388
Šámal, Michal	381
Šebo, Peter	384
Šimánek, Vilím	378
Šindelář, Vladimír	386, 387
Šistková, Jana	374
Šmarda, Jan	383
Šmardová, Jana	375, 383, 385
Šmečilová, Mária	373
Šmejkal, Karel	367
Štefančíková, Lenka	385
Štefániková, Andrea	371
Štefko, Martin	385
Štěpánková, Veronika	386
Štěpnička, Petr	383, 387
Šulc, Miroslav	376
Švec, Jan	387
Tauchman, Jiří	387
Teplý, Filip	381
Tichý, Boris	376
Tichý, Lukáš	388
Tóthová, Eva	388
Trbušek, Martin	376
Turkenburg, Johan P.	363
Uldrijan, Stjepan	365, 366
Ulrichová, Jitka	378, 391
Valentová, Kateřina	378
Vaničková, Lucie	389
Vášová, Ingrid	385
Vávra, Jan	381
Veselý, Jan	390
Vinklárek, Jaromír	365
Víšek, Benjamín	364
Vojtěšek, Bořivoj	379
Vousden, Karen H.	365
Watson, Christopher J.	363
Wimmerová, Michaela	368
Zapletalová, Eva	390
Zapletalová, Petra	388
Závalová, Veronika	367
Zdařilová, Adéla	391
Zimmer, Christian	373
Žáková, Lenka	363
Žúziová, Jozefína	388

