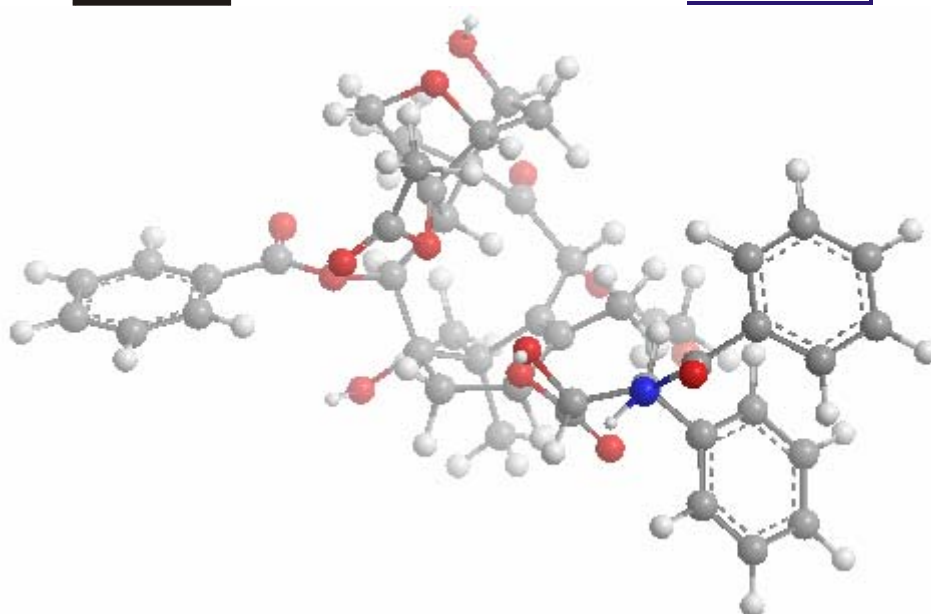




SIGMA-ALDRICH



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

10.6. – 13.6. 2008

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

VIII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků

Bylo, nebylo, za devaterými horami žili kdysi mladí chemici. Bývala trochu jiná doba, „šéfové“ byli přísní, a zatímco dovolovali mladým pracovat i v sobotu a v neděli a dovolená se poznala podle toho, že se šlo do práce až v devět hodin, nedovolovali jim jezdit na žádné konference, aby se nerozptylovali od práce. Šéfové na konference, zejména do ciziny, jezdili raději sami. Měli také jistotu, že žádný mladý moula nevyzradí vědeckým kontrarevolucionářům tajemno, na kterém zrovna pracoval, neboť takové vyzrazení by pak zřejmě otrásllo i Varšavskou smlouvou a RVHP.

Ti mladí chemici se jednou takhle odpoledne u čaje usnesli, že udělají naopak mezinárodní konferenci, na kterou nevezmou, jak se tehdy říkalo, „mechem obrostlé staříky“. A stalo se. Když po letech moudří otcové v Bruselu, přijímající nás „Čechoslováky“ milostivě mezi „lidi“, pronesli, „... well, můžete taky udělat konferenci pro mladé vědce, máme to tady takovou novinku ...“, bylo velmi příjemné odpovědět: „... inu, taková tradice je u nás již od 80. let minulého století a velmi se osvědčuje ...“.

Když pak přišel Martin Fusek s nápadem ještě na takové konferenci, kterou by pro podporu věci zorganizovala firma Sigma-Aldrich CZ, odměnit grantem dva nejlepší příspěvky, vznikla věc, která mnoho obdoby na světě nemá. Ocenění tohoto typu je dnes již tradičně „prestížním“, což je vidět i z toho, že ocenění jsou v poslední době zváni na přednášky do okolních zemí tamními odbornými společnostmi. A kromě toho, co se probojuje na tuto konferenci, můžeme s určitou nadsázkou říci, že už mnoho, co by stálo za dobré slovo, v našich krajích nezbývá (anebo nemělo by zbývat).

Je tedy nad slunce jasné, že pár šťastných odvážlivců, kteří neseděli za pecí a nebáli se nést svou kůži na trh, má jeden malý kamínek do svého odborného životopisu. A navíc k tomu má desítky nových známých a přátel ze všech koutů odborného života, z řady biologů, biochemiků, chemiků a odborníků věd příbuzných. To jsou dvě nepopiratelné devizy akce, která se letos koná v této podobě již po osmé. Devizou třetí je letos i to, že se akce rozprostřela ze zemí česky mluvících i na Slovensko, protože zde není jazyková bariéra a protože na obou stranách Slovensko-Moravské hranice se dělá jak pěkné vínko, tak poctivá práce, která si zaslouží, aby byla vidět.

Společnosti Sigma-Aldrich za to budiž vyřčena veřejně pochvala!

Pavel Drašar

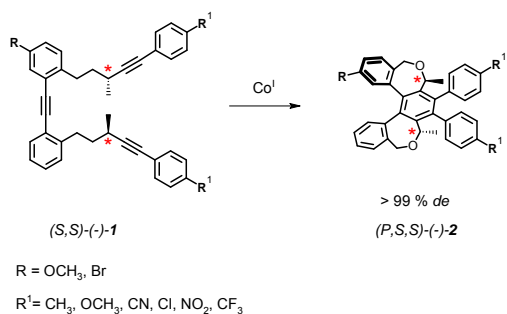
PŘÍPRAVA HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LÁTEK PRO VYUŽITÍ V ASYMETRICKÉ KATALÝZE

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

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

Neracemické helicity jako inherentně chirální 3D struktury jsou slibnými kandidáty na ligandy, které lze použít v různých enantioselektivních reakcích katalyzovaných tranzitními kovy. V naší laboratoři byla vyvinuta diastereoselektivní syntéza helicenů založená na [2+2+2] cyklotrimerizaci, která umožňuje připravit tyto látky v preparativním měřítku a ve vysoké optické čistotě^{1,2}.

Z důvodu pozdějšího snadného zavedení vhodných ligačních skupin byla pozornost soustředěna na přípravu methoxy- a bromderivátu **2**. Byl vypracován jednoduchý a modulární syntetický přístup, umožňující připravit celé spektrum pentacyklických látek. Klíčová cyklotrimerizace **1** → **2** poskytovala žádaný produkt ve vysokém výtěžku a s vynikající stereoselektivitou (> 99 % *de*).



V příspěvku bude podrobně diskutována optimalizace přípravy těchto látek a možnosti jejich převedení na chirální ligandy použitelné v enantioselektivní katalýze.

Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg.č. 203/07/1664), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg.č. LC05A57).

LITERATURA

- Starý I., Stará I. G., Alexandrová Z., Sehnal P., Teplý F., Šaman D., Rulišek L.: *Pure Appl. Chem.* 78, 495 (2006).
- Sehnal P., Krausová Z., Teplý F., Stará I. G., Starý I., Rulišek L., Šaman D., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 73, v tisku (2008).

ZMĚNY V METABOLIZME AMYLOIDNĚHO PREKURZOROVÉHO PROTEÍNU PO EXPERIMENTÁLNE INDUKOVANEJ ISCHÉMII

EVA BABUŠÍKOVÁ^a, NATALIA NALIVAEVA^b,
DUŠAN DOBROTA^a, JOZEF HATOK^a, RENÁTA
KIRSCHNEROVÁ^a a ANTHONY TURNER^b

^aUniverzita Komenského v Bratislave, Ústav lekárskej biochemie, Jesseniova lekárska fakulta, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko, ^bInštitút molekulárnej a bunkovej biológie, Fakulta biologických vied, Univerzita Leeds, Leeds, LS2 9JT, Veľká Británia
babusikova@jfm.uniba.sk

Mozgová ischemia má často nepriaznivú prognózu a dlhšie trvajúca ischemia spôsobuje ireverzibilné zmeny a poškodenie buniek nervového systému. Existuje predpoklad, že jedným z následkov ischemie môže byť v neskoršom veku rozvoj a vznik Alzheimerovej choroby. Presné mechanizmy, ktoré sú za takéto prepojenie zodpovedné, dodnes nie sú jasné. Amyloidný prekurzorový proteín (APP) môže byť upravovaný ne-amyloidnou (alfa-sekretáza) alebo amyloidnou dráhou (beta- a gama- sekretáza) za vzniku toxického amyloidného beta peptidu (Abeta), ktorý zohráva dôležitú úlohu v rozvoji Alzheimerovej choroby. V našej štúdií sme sledovali účinok globálnej ischemie, indukovanej u potkanov, na úpravu APP. Zistili sme, že počas ischemie dochádza v mozgových hemisférach k nárastu APP, pričom počas reperfusiony sa hladina APP vrátila na úroveň kontrolnej skupiny zvierat. Hladina beta-sekretázy tiež štatisticky významne narastala počas ischemie. Medzi významné Abeta degradujúce enzýmy patria neprilysin, endotelín-konvertujúci enzým. Hladiny týchto enzýmov sa po ischemii štatisticky významne znížili. Počas ischemie sme pozorovali aj nárast oxidačného poškodenia. Naše výsledky naznačujú, že ischemia vedie ku amyloidnej úprave APP a zvýšený oxidačný stres by mohol prispievať k smrti neurónov.

Tento grant bol podporený MVTS grantom Angl/Slov/JLF/07.

PLATINUM(IV) COMPLEX LA-12 PERTURBES CELL CYCLE AND CAUSES APOPTOSIS IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELL LINES

OLGA BLANÁŘOVÁ^{a,b}, A. VACULOVÁ^a,
K. SOUČEK^a, J. HOFMANOVÁ^a, P. SOVA^c,
and A. KOZUBÍK^{a,b}

^aDepartment of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, Brno; ^bMasaryk University, Brno; ^cR&D, Pliva-Lachema a.s., Brno

Platinum chemotherapeutics are widely used in treatment of various solid tumors. Recently, platinum(IV) complexes have been introduced as an important approach to the treatment of cancer. Novel promising anticancer adamantylamine Pt(IV) complex LA-12 was found to be

highly effective in cell lines derived from tumors of different origin. We studied the cytotoxic action of LA-12 in colorectal cancer cell line HCT116 in comparison to Pt(II) derivate oxaliplatin, established as a standard therapy of colorectal cancer. After incubation with LA-12, we observed accumulation of the cells in S and G2/M phases of the cell cycle and strong cell-cycle-phase specific induction of apoptosis. On the contrary, oxaliplatin was less potent in altering proliferation and causing cell death. Furthermore, HCT116 p53^{-/-} and HCT116 p21^{-/-} cells were more resistant to oxaliplatin cytotoxic effects, whereas they retained sensitivity to LA-12.

This work was supported by the IGA grant No. IQS500040507 of the Academy of Sciences of the Czech Republic and the Czech Science Foundation, grant No. 301/07/1557.

USE OF CHIRAL SEPARATIONS FOR THE DETERMINATION OF ENZYME ENANTIOSELECTIVITY

JIRI BRICHAC^{a,b,c}, JIŘÍ ZIMA^c, MICHAEL KOTIK^b, ALES HONZATKO^a, and MATTHEW J. PICKLO^a

^aDep Pharmacology, Physiology, and Therapeutics, University of North Dakota, Grand Forks, ND 58203-9024, USA; ^bLaboratory of Enzyme Technology, Institute of Microbiology, AS CR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4; ^cDepartment of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2
brichac@email.cz

Enantioselectivity is the ability of chiral environment to distinguish between two enantiomers. Enantioselective enzyme prefers one enantiomer as a substrate or preferentially forms one enantiomer over the other in an enzymatic reaction.

Enantioselective enzymes are very useful biocatalyzators allowing cheap preparation of optically pure chemicals. In this work, we determined enantioselectivity of novel microbial epoxide hydrolases. Enantiopure epoxides prepared by an enzyme kinetic resolution of racemates can serve as valuable building blocks in an organic synthesis. In order to measure the enantioselectivity, we developed methods for analyses of various chiral epoxides using a chiral GC on cyclodextrine-based stationary phases. We showed, that epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* M200 reacts with *tert*-butyl glycidyl ether in enantioselective manner¹.

In the second part of this study, we elucidated the basis of enantioselective oxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) by brain mitochondria². HNE is a cytotoxic product of lipid peroxidation involved in numerous diseases, including Alzheimer's disease. Here, we described enzyme kinetics of HNE enantiomers detoxification to *trans*-4-hydroxy-2-nonenic acid (HNEA) by aldehyde dehydrogenases (ALDHs)³. Furthermore, we developed direct and indirect HPLC methods for HNEA

enantioseparation⁴. Our results showed, that rat ALDH5A enantioselectively oxidized (*R*)-HNE with retention of stereoconfiguration, whereas rat ALDH2 was not enantioselective.

The authors gratefully acknowledge NIH grants P20 RR17699-05 COBRE (M.J.P.) and AA15145-01 (M.J.P.) and AS CR grant Z5020903-I027 (M.K.) and grant SM0021620857 (J.Z.).

REFERENCES

1. Kotik M., Brichac J., Kyslik P.: J. Biotechnol. 120, 364 (2005).
2. Honzatko A., Brichac J., Murphy T. C., Reberg A., Kubatova A., Smoliakova I. P., Picklo M. J., Sr.: Free Radical Biol. Med. 39, 913 (2005).
3. Brichac J., Ho K. K., Honzatko A., Wang R., Lu X., Weiner H., Picklo M. J., Sr.: Chem. Res. Toxicol. 20, 887 (2007).
4. Brichac J., Honzatko A., Picklo M. J.: J. Chromatogr., A. 1149, 305 (2007).

SYNTÉZA THIAMAKROCYKLŮ PRO KOMPLEXACI FULLERENŮ

MICHAL BUCHTA^a, PETR HOLÝ^b, JIŘÍ RYBÁČEK^b, ŠÁRKA LIPNICKÁ^b a MARTIN BĚLOHRADSKÝ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
michal.buchta@vscht.cz; petrholý@uochb.cas.cz

V programu syntézy makrocyclických ligandů pro komplexaci fullerenu se zabýváme přípravou thiamakrocycklů z elektronově bohatých aromatických platform a 4,5-bis(2-kyanoethylthio)-1,3-dithiol-2-thionu **I** jako rovněž elektronově bohatého spojivého prvku. Ze struktury **I** lze ve dvou krocích odstranit kyanoethyltové skupiny a generované thiolátové skupiny postupně alkylovat¹. Při alkylování bis(halomethyl)aromátem lze oba tyto stavební bloky postupně řetězit a z acyklického prekurzoru uzavřít makrocycklus. Na tomto principu se podařilo realizovat postupnou výstavbu makrocycklů **III** ze 4 molekul 1,4-bis(brommethyl)benzenu **II** a 4 spojivých jednotek **I** (Schéma 1).

Makrocycklus **III** má již dutinu odpovídající velikosti fullerenu C₆₀, jak ukazuje molekulové modelování metodou AM1. Na syntézu makrocycklů **III** navazuje studium tvorby naznačeného inkluzního komplexu a aplikace vypracované syntetické strategie na další vhodně volené bis(halomethyl)aromáty pro optimalizaci velikosti dutin a elektronických vlastností vznikajících makrocycklů a zlepšení jejich rozpustnosti.

Práce je prováděna za finanční podpory GA AV ČR (grant č. IAA400550704).

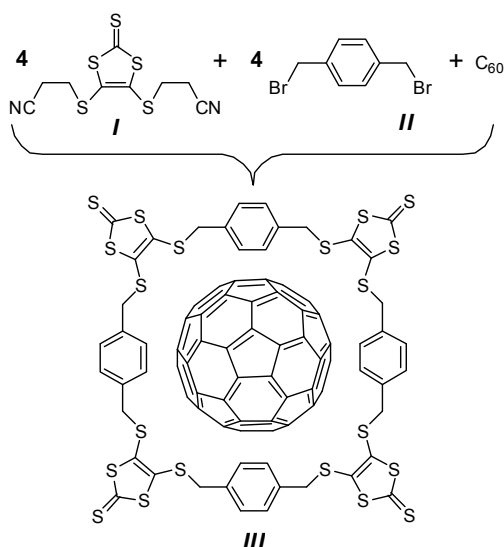


Schéma 1

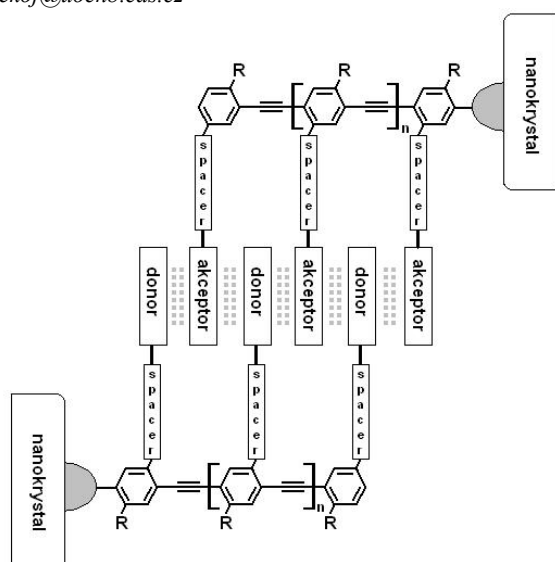
LITERATURA

1. Simonsen K. B., Svenstrup N., Lau J., Simonsen O., Mørk P., Kristensen G. J., Becher J.: *Synthesis* 3, 407 (1996).

DONOR-AKCEPTOROVÉ SYSTÉMY JAKO MATERIÁLY PRO MOLEKULÁRNÍ ELEKTRONIKU

VÁCLAV DEKOJ, MARTIN BĚLOHRADSKÝ,
ŠÁRKA LIPNICKÁ a IVO STARÝ

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



Interakce mezi elektronově bohatými a elektronově chudými organickými sloučeninami je známa dlouhou dobu a je využívána v řadě syntéz a aplikací. Materiály využívající

této interakce jsou perspektivní i z hlediska využití v molekulární elektronice. Na schématu je vyobrazena struktura připravovaných materiálů, jejichž hlavním atributem je možnost dvoudimenzionální vodivosti. Oligofenylacetyleny jsou známé molekulární vodiče a ve zkoumaných systémech tvoří páteřní segmenty donorních či akceptorních oligomerů. Vodivost v kolmém směru je zajišťována interakcí mezi donory a akceptory. Pro zajištění optimální donor-akceptorní interakce je každý monomer vybaven spacerem zajišťujícím určitou flexibilitu interagujících částí monomerů. V budoucnu bude studována možnost napojení studovaných oligomerů na monokrystaly a budou provedeny testy vodivosti takového systému.

HETEROGENNÍ KATALYZÁTORY PRO HECKOVU REAKCI

JAN DEMEL^{a,b}, SANG-EON PARK^c, JIŘÍ ČEJKA^b
a PETR ŠTĚPNIČKA^a

^aUniverzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2; ^bÚstav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 18223 Prague 8; ^cKatedra chemie, Inha University, Incheon 402-751, Korejská republika
demelj@jh-inst.cas.cz, stepnic@natur.cuni.cz

Palladiem katalyzované spojovací reakce jsou v posledních desetiletích intenzivně studované pro jejich širokou použitelnost v organické syntéze. Z těchto reakcí je pravděpodobně nejčastěji používaná Heckova reakce, tedy reakce alkenů s arylhalogenidem, při které vzniká substituovaný alken. Použitý katalyzátor může být palladnatá sůl, fosfinové komplexy palladia, palladacykly, nebo také palladiové nanočástice. Jedny z prvních heterogenních katalyzátorů byly nanočástice nanesené na pevném nosiči například aktivním uhlí, organickém polymeru, zeolitu nebo silikagelu.

Podlejší se ukázalo, že různé modifikující skupiny zakotvené na nosiči výrazně zlepšují vlastnosti vzniklých katalyzátorů¹. Také již není nutné palladium redukovat, protože tyto modifikující skupiny jsou schopné vázat i palladnaté soli.

V naší práci jsme připravili sérii mesoporézních molekulových sít se zakotvenými aminoskupinami na povrchu. Tyto materiály jsme modifikovali octanem palladnatým a testovali v modelové Heckově reakci butylakrylátu s brom-benzenem za vzniku butylesteru kyseliny skořicové. Studovali jsme průběh reakce při použití mikrovlnného ohřevu oproti použití klasického hydrotermálního zahřívání. Dosažené konverze dosáhly až 90 % po 30 minutách reakce v mikrovlnné peci.

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

LITERATURA

1. Phan N. T. S., Van Der Sluys M., Jones C. W.: *Adv. Synth. Catal.* 348, 609 (2006).

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY IZOLOVANÉ Z PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

**IVANA DOLEŽÍLKOVÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^a,
TOMÁŠ MACEK^b a ZUZANA CHRASTILOVÁ^a**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
dolezili@vscht.cz

Rezistence k antimikrobiálním látkám se vyvinula u širokého spektra nozokomiálních a sekundárních infekcí, přičemž není výjimkou odolnost mikroorganismů i vůči širokospektrým preparátům. Vzhledem k masivnímu užívání antibiotik v minulých desetiletích se rezistence dostala do popředí zájmu, i přes v současnosti velké spektrum dostupné množství antibiotik. Bakterie vyvinuly několik mechanismů rezistence typu zabránění vstupu antibiotika do buňky či jeho navázání na specifické místo, produkce inaktivujícího enzymu, či změna vazebného místa a jsou schopné eliminovat účinek řady látek. Proto je tedy důležité vyvinout antimikrobiální látky s novým mechanismem účinku, které mohou obejít vývoj rezistence.

U kationických antimikrobiálních peptidů jako nové skupiny antibiotik nacházíme mnoho žádoucích vlastností. Mají široké spektrum účinku, zabíjejí bakterie rychle, jejich účinek není ovlivněn známými mutacemi způsobující rezistenci na antibiotika, s běžnými antibiotiky působí většinou synergisticky a neutralizují endotoxin. V současnosti bylo popsáno více než 700 peptidů. Tyto peptidy nezabíjejí pouze patogenní mikroorganismy, zahrnující grampozitivní a gramnegativní bakterie, viry, protozoa a mikroskopické vláknité houby, ale rovněž podporují a doplňují vrozený imunitní systém. Pro tyto peptidy je charakteristický pozitivní náboj, méně než 50 aminokyselin a mají hydrofobní charakter, který jim umožňuje zaujmout amfipatickou konformaci a interagovat s membranou patogenů. Vývoj peptidů pro farmaceutické účely je spojen s objasněním, jak struktura peptidů ovlivňuje mechanismus účinku.

V této práci jsme se zaměřili na izolaci a charakterizaci látek peptidové povahy s antimikrobiálním a antifungálním účinkem z rostlinného materiálu. Rozličné typy antimikrobiálních látek byly získány z různých částí rostlin nebo mezibuněčných tekutin. Antimikrobiální peptidy byly izolovány v několika krocích srážením bílkovinných frakcí, purifikovány pomocí afinitní a ionexové FPLC a charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami: UV-VIS spektroskopii, SDS-PAGE a tricinovou elektroforézou. Byla testována antibakteriální a antifungální aktivita s cílem prokázat účinnost a vhodnou koncentraci. Jako testovací modely byly použity patogenní a potenciálně patogenní bakterie: *G*⁻ – *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium rhizogenes*; *G*⁺ – *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumillus*, *Arthrobacter ureafaciens*. V případě testování antifungální aktivity byly použity plísňe: *Fusarium culmorum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus terreus* a *Alternaria* sp.

Metodicky byly použity rychlá screeningová difuzní metoda na agaru a metoda využívající přístroj Bioscreen, kde je monitorován růst bakterií v závislosti na době inkubace a účinnosti příslušného peptidu. Z rostlinného materiálu se podařilo izolovat frakce z listů *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea*, *Armoracia rusticana*, semen *Pulsatilla* sp. a tkáňových kultur *Armoracia rusticana*, které působily inhibičně na houby *Cladosporium herbarum*, *Alternaria* sp. a bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megatherium* a *Citrobacter* sp.

Autoři děkují grantové podpoře MSM 6046137305 a FRVS 1069/2008.

TAUTOMERY DERIVÁTŮ PYRIMIDINU S *sp*³ HYBRIDIZOVANÝM UHLÍKEM ČÍSLO 5

MARTIN DRAČÍNSKÝ a MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ

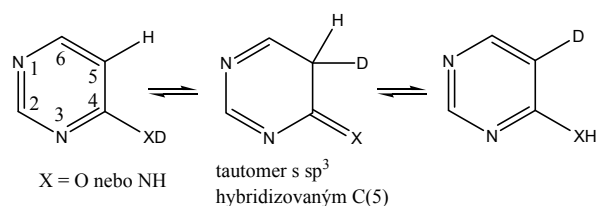
Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
dracinsky@uochb.cas.cz

Deriváty pyrimidinu jsou součástí mnoha přírodních látek včetně nukleových kyselin a také celé řady léčiv¹. Při NMR studiu derivátů pyrimidinu v D₂O jsme zjistili, že intenzita signálu vodíku v poloze 5 pyrimidinového kruhu časem klesá v důsledku výměny vodíku za deuterium. Vybrali jsme sérii 17 derivátů pyrimidinu, u které byla studována rychlost této izotopické výměny při různých pH.

V kyselém prostředí, kde jsou deriváty pyrimidinu protonovány, je meziproductem izotopické výměny C(5)-protonovaný derivát. Experimentálně zjištěné hodnoty Δ*G*[#] dobře korelují s *ab initio* vypočtenými rozdíly volné energie mezi N- a C(5)-protonovanými formami.

V bazickém prostředí dochází také k izotopové výměně vodíku v poloze 5. V tomto případě lze uvažovat o dvou možných mechanismech izotopové výměny. Jednak i v bazickém prostředí je malá frakce pyrimidinových molekul protonována (v závislosti na rozdílu p*K*_a a pH) a k výměně tedy může docházet přes C(5) protonovanou formu podobně jako v kyselém prostředí. U derivátů, kde dochází k výměně tímto mechanismem, lze pozorovat lineární závislost dekadického logaritmu rychlostní konstanty na pH (při zvýšení pH o 1 se desetkrát sníží koncentrace protonované formy a tím pádem se i desetkrát sníží rychlost izotopické výměny).

U derivátů pyrimidinu, které obsahují hydroxyl nebo aminoskupinu, je izotopová výměna v bazickém prostředí rychlejší než by odpovídalo zastoupení protonovaných forem a navíc tato rychlost téměř není závislá na pH. V tomto případě lze izotopovou výměnu vysvětlit mechanismem, ve kterém se objevuje tautomer pyrimidinu s *sp*³ hybridizovaným uhlíkem v poloze 5. Tento tautomer nebyl dosud pozorován ani uvažován jako jedna z možných forem tautomerní rovnováhy².



LITERATURA

- Holý A: *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, Univerzita Palackého, Olomouc 2004.
- Jalbout A. F., Trzaskowski B., Xia Y., Li Y., Hu X., Li H., El-Nahas A., Adamowicz L.: *Chemical Physics* 332, 152 (2007).

KVASINKY – CENNÝ NÁSTROJ PRE ŠTÚDIUM REGULÁCIE PROGRAMOVANEJ BUNKOVEJ SMRTI

B. DROBCOVÁ, M. MENDEL, I. KIŠŠOVÁ, J. KOLAROV a P. POLČIC

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovensko

Apoptóza je prísne regulovaná forma programovanej bunkovej smrti s významnou úlohou vo vývoji a homeostáze vyšších eukaryotov. Tento mechanizmus zabezpečuje rýchle odstránenie nepotrebných a potenciálne nebezpečných buniek v mnohobunkovom organizme bez negatívnych vplyvov na okolité tkanivo. Porucha regulácie tohto fyziologického procesu býva preto obvyklou príčinou mnohých závažných ľudských ochorení ako sú nádorové, neurodegeneratívne, autoimunitné a ďalšie ochorenia. Objasňovanie molekulárnych mechanizmov kontrolujúcich apoptózu poskytuje nové možnosti liečby týchto ochorení, a preto sú stále predmetom intenzívneho výskumu.

Hoci sa na kontrole apoptózy podieľa mnoho proteínov, kľúčovými regulátormi sú proteíny evolučne konzervovanej Bcl-2 rodiny, ktoré kontrolujú permeabilitu vonkajšej mitochondriálnej membrány a tým uvoľnenie cytochrómu c a ďalších apoptogénnych faktorov z mitochondriálneho medzimembránového priestoru do cytoplazmy – udalosť, ktorá zahajuje apoptotický program.

Bcl-2 proteínová rodina obsahuje pro- aj proti-apoptotických členov. Proteíny s pro-apoptotickou funkciou, ako Bax a Bak, podporujú uvoľnenie cytochrómu c a v zdravých bunkách sú inhibované proti-apoptotickými členmi rodiny Bcl-2, ako sú Bcl-2 a Bcl-x_L. V rámci skupiny pro-apoptotických členov ešte existuje podskupina tzv. „BH3-only“ proteínov, ktoré sú rozmiestnené v rôznych bunkových kompartmentoch a ich úlohou je po zaznamenaní apoptotického signálu aktivovať pro-apoptotické proteíny Bax a Bak. Mechanizmus, akým „BH3-only“ proteíny kontrolujú následnú aktiváciu a oligomerizáciu týchto molekúl vo vonkajšej mitochondriálnej membráne však stále nie je objasnený.

Cieľom nášho výskumu je s využitím alternatívneho kvasinkového systému objasniť mechanizmus aktivácie multidoménoých pro-apoptotických proteínov „BH3-only“ proteínmi. Naše štúdium interakcií „BH3-only“ proteínu Bim s multidoménoými Bcl-2 proteínmi ukázalo, že pro-apoptotický účinok tohto proteínu spočíva v inhibícii záchranej aktivity účinku proti-apoptotických proteínov (Bcl-x_L a Bcl-2) v mitochondriách. Je veľmi pravdepodobné, že rovnaký molekulárny mechanizmus pro-apoptotického účinku proteínu Bim sa uplatňuje aj v cicavčích bunkách.

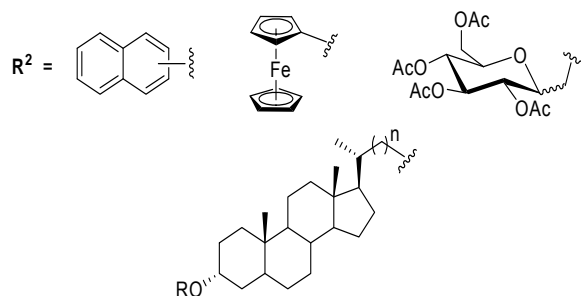
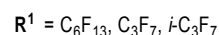
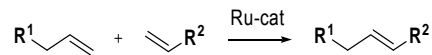
Táto práca bola podporená v rámci grantov APVT-20-012404, NATO RIG 981468 a UK/241/2007.

CROSS-METATHEZE 3-(PERFLUORALKYL)PROPENŮ S TERMINÁLNÍMI ALKENY

BARBARA EIGNEROVÁ^{a,b} a MARTIN KOTORA^{a,b}

^a*Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2;* ^b*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6*
kotora@natur.cuni.cz

Zavedení jedné či více molekul fluoru do sloučenin mění její biologické vlastnosti (např. zvýšení metabolické stability), čehož se široce využívá ve farmaceutickém průmyslu¹. Náš výzkum se zabývá hledáním nových metodik zavedení perfluoralkylového řetězce do různých strukturních typů molekul za mírných reakčních podmínek. Jednou z dostupných možností je rutheniem katalyzovaná cross-metateze alkenů².



Tato metoda je založena na metatezi snadno připravitelných 3-(perfluoralkyl)propenů s terminálními alkeny katalyzované Hoveyda-Grubbsovým katalyzátorem. V rámci tohoto projektu se podařilo syntetizovat celou řadu sloučenin nesoucích různé perfluoralkylové řetězce, např. steroidy, metalloceeny, areny a sacharidy, ve vysokých výtěžcích.

Tato práce vznikla za podpory Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT (projekt č. 1M0508) a grantové agentury AVČR (projekt č. IAA 400 550 609).

LITERATURA

1. Isanbor C., O'Hagan D.: J. Fluorine Chem. 127, 303 (2006).
2. Imhof S., Randl S., Blechert S.: Chem. Commun. 2001, 1692.

**PRÍPRAVA SEMISYNTETICKÝCH
GLYKOKONJUGÁTOV O-ANTIGÉNU *Vibrio cholerae***

PAVOL FARKAŠ a SLAVOMÍR BYSTRICKÝ

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta
9, 845 38 Bratislava
chempalo@savba.sk

Príprava nových glykokonjugátov je v súčasnosti výzvou pre chemikov a biochemikov. Jedným z dôvodov štúdia týchto konštruktov je všeobecná T-bunková nezávislosť polysacharidov. Naším cieľom bolo pripraviť nový typ multivalentného glykokonjugátu. Antigén (O-špecifický polysacharid, O-SP, získaný z lipopolysacharidu *Vibrio cholerae*) sme sa rozhodli primárne viazať na glukánový polysacharidový nosič. Príprava a derivatizácia glukánov použitých ako makromolekulový nosič je publikovaná¹. Prvým krokom syntézy je príprava konjugátu glukánu a O-SP reduktívnou amináciou, pripravili sa dva konjugáty. Sacharid - sacharidový konjugát sa z reakčnej zmesi izoloval gélovou chromatografiou a charakterizoval ¹H-NMR spektroskopiou. Na základe intenzity píkov sme odhadli zloženie konjugátov. O-SP sa naviazal na 18 a 43 % ramienok na glukánovom nosiči. Dosiahol sa "vetvenie" 2 a 6 % O-SP na monoméru jednotku glukánového nosiča. Druhým krokom bolo viazanie proteínu (BSA). Vo výsledných konjugátoch sa po prečistení stanovil obsah proteínov na 12 a 22 %. Podarilo sa pripraviť konjugáty s veľkým počtom sacharidových epitopov na primárnom polysacharidovom nosiči. Ďalej sa úspešne viazal proteín, čím získal konštrukt navyše T-bunkové epitopy. Získané semisyntetické glykokonjugáty boli testované na myšiach. Získané poznatky budú aplikované v ďalšom výskume.

Táto práca vznikla s finančnou podporou Slovenských grantových agentúr (APVV 0032-06 a VEGA 2/7029/27).

LITERATURA

1. Farkaš P., Bystrický S.: Carb. Pol. 68, 187 (2007).

**ŠTÚDIUM ŠTRUKTÚRY RETROVIROVÝCH ČASTÍČ
VYUŽITÍM AFM**

**FŮZIK TIBOR, PAVEL ULBRICH,
YURII KUZNETSOV, ALEXANDER MCPHERSON
a TOMÁŠ RUML**

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Mikroskopia atomárných síl (Atomic Force Microscopy – AFM) bola po prvýkrát popísaná v roku 1986 a zo začiatku bola využívaná hlavne v materiálno-technologických výskumoch na ultrajemnú charakterizáciu povrchu. Keďže prvé AFM mikroskopy merali v kontaktnom režime, zobrazovanie mäkkých biologických materiálov bolo takmer nemožné. Až ďalší rozvoj metód a zavedenie takzvaného poklepového režimu (často pomenovaného aj „semi-contact mode“), umožnilo rýchlejší rozvoj využitia AFM i v biologickej oblasti. Toto usporiadanie umožňuje zobrazovanie povrchov biologických objektov za fyziologických podmienok s minimálnymi požiadavkami na úpravu a prípravu vzorky. AFM mikroskopia sa v súčasnosti úspešne používa na zobrazovanie biologických makromolekúl ako sú DNA, proteíny, ich vzájomných interakcií ako aj na zobrazovanie biologických membrán a bunkový stien baktérií. Keďže AFM mikroskopiou sa dá dosiahnuť až nanometrové rozlíšenie, ukázala sa ako vhodný nástroj na štúdium vírusových častíc, ktoré bolo možné doposiaľ zobraziť iba elektrónovou mikroskopiou. Na rozdiel od elektrónovej mikroskopie, kde je vzorka nutne vysušená, zmrazená alebo pokrytá jemnou vrstvou kovu, AFM umožňuje zobrazovať vírusové častice v ich fyziologickom prostredí, čo umožňuje zachovanie ich skutočnej štruktúry a rozmerov, resp. štúdium vplyvu zmeny prostredia na tvar a štruktúru častice prevedenom *in situ*.

V tejto práci sme sa zamerali na štúdium štruktúry retrovirových častíc Mason-Pfizerovho opičieho vírusu (M-PMV) metódou už spomenutej AFM mikroskopie. Častice boli poskladané *in vitro* z delečného mutantu štruktúrneho polyproteinového prekursora Gag M-PMV, ktorý reprezentuje nezrelú časticu tohto vírusu. Častice vykazovali pravidelnú štruktúru trigonálnej symetrie zloženú z domén usporiadaných do hexagonálnych kruhov, čo napovedá novej ikozaedrickej organizácii tohto vírusu.

Táto práca bola podporená grantom KAN208240651, KJB501270701, 1M6837805002NR8797 a MSM6046137305.

**VYUŽITÍ KONFOKÁLNEJ MIKROSKOPIE
V BUNĚČNÉ BIOLOGII**

GABRIELA GALIOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Laserová skenovací konfokálna mikroskopia se často využívá v buněčné biologii, kde dříve dominovala elektronová mikroskopia. Její výjimečnost spočívá v možnosti nahlédnout hluboko do nitra živých i fixovaných buněk a tkání, získat ostře definované optické řezy a z nich vytvořit trojrozměrnou rekonstrukci různých buněčných struktur. Vývoj této techniky byl značně urychlen novými poznatky v počítačové technice, laserových systémech, detektorech a fluoroforech a všechny tyto oblasti se stále zdokonalují. Konfokální mikroskopia má široké uplatnění při vizualizaci a sledování změn na úrovni chromozomálních teritorií, genů, ale i v oblasti proteomiky. Tato technika

umožňuje studium mechanizmů životně důležitým procesů v buňkách, jako je například replikace, transkripce, sestřih nebo DNA reparace. K velmi důležitým aplikacím konfokální mikroskopie patří sledování změn ve struktuře genomu nádorových buněk, což přispívá k objasnění podstaty vzniku nádorové transformace. Konfokální mikroskopie v kombinaci s různými fluorescenčními metodami, jako je například fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), se dnes hojně využívá v klinické diagnostice. Odhalení různých chromosomálních aberací jak v biologii nádorů, tak v prenatalní diagnostice, má velký terapeutický význam. Konfokální mikroskopie v kombinaci s imuno-fluorescencí a „fotobleachingem“ (FRAP technika) je často důležitým nástrojem základního výzkumu.

V naší laboratoři (LMCC, BFÚ AV ČR Brno) se zabýváme studiem struktury buněčného jádra a epigenetickými mechanizmy regulace genové exprese u buněk nádorových i u lidských embryonálních kmenových buněk podléhajících diferenciaci. Velká část experimentů řeší problematiku detekce exprese diagnosticky významných genů a dále se zabýváme přípravou DNA sond pro FISH techniky, které mohou být potenciálně využity klinickými pracovišti.

LITERATURA

1. Kozubek M., Kozubek S., Lukášová E., Marečková A., Bártová E., Skalníková M., Jergová A.: *Cytometry* 36, 279 (1999).
2. Dudová S., Bártová E., Pour L., Krejčí J., Hájek R.: *Klinická onkologie, Supplement 2, 19, 397* (2006).

NOVÉ INHIBITORY CYTOKININ OXIDASY/DEHYDROGENASY – PŘÍPRAVA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA

**MARKÉTA GEMROTOVÁ, MAREK ZATLOUKAL,
KAREL DOLEŽAL, LUKÁŠ SPÍCHAL
a MIROSLAV STRNAD**

*Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a
Ústav experimentální botaniky AV ČR, CZ-78371 Olomouc
market.gem@centrum.cz*

Cytokiny jsou fytohormony hrající významnou roli v regulaci buněčného cyklu, diferenciaci, růstu, senescence a mnoho dalších důležitých procesů. Přirozené cytokiny jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem na N⁶, který může být aromatický nebo isoprenoidní. Modulace hladiny aktivních cytokinů v rostlině vede k zajímavým fyziologickým účinkům.

Cílem naší studie bylo připravit deriváty 2-X-6-anilinopurinů (X = H, halogen, amino, methylthio, nitro) s různě substituovanými fenoly a porovnat vliv jednotlivých substitucí na biologickou aktivitu těchto látek. Jelikož jsou všechny tyto látky podobné cytokininům, byly testovány jak v klasických cytokininových biotestech (kalusový test, amaranthový, senescenční test s listy pšenice), tak i v receptorovém testu a CKX (cytokinioxidasa/dehydrogenasa) inhibičním testu. V receptorovém testu byla

studována schopnost různě substituovaných anilinopurinů aktivovat cytokininovou signální dráhu skrze receptory (AHK3 a AHK4/CRE1), které byly jednotlivě exprimovány v transgenických bakteriích *Escherichia coli*¹. V inhibičním testu byla stanovena schopnost připravených látek inhibovat aktivitu CKX, enzymu degradace cytokininů, který byl připraven expresí v kvasině *Saccharomyces cerevisiae*². Většina nově syntetizovaných anilinopurinů účinně inhibovala aktivitu CKX enzymu *in vitro*, přičemž některé látky vykazovaly slabou ligandovou afinitu k cytokininovým receptorům. Inhibiční schopnost látky 2-chloro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurinu byla potvrzena *in vivo* na rostlinách tabáku nadprodukcujících tento enzym, u kterých došlo po aplikaci ke komplementaci přirozeného fenotypu.

Tato práce byla podpořena grantem MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmölling T.: *Plant Cell Physiol.* 2004, 1299.
2. Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T., Schmölling T., Peč P.: *Anal Biochem.* 2002, 1.

REZISTENCIA HT-29 BUNIEK PO FRAKCIONOVANEJ FOTODYNAMICKEJ TERAPII A PROTEÍNY TEPELNÉHO ŠOKU

**LUCIA GRADA KULIKOVÁ^{a,b},
GIUSEPPE PALUMBO^b a PÉTER FEDOROČKO^a**

*^aÚstav biologických a ekologických vied, PrF, Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovensko; ^bDipartimento di biologia e patologia cellulare e molecolare L. Califano, Istituto di endocrinologia ed oncologia sperimentale/CNR, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Neapol, Taliansko
lucia.grada.kulikova@upjs.sk*

Fotodynamická terapia (PDT) je alternatívna metóda liečby nádorového tkaniva založená na princípe fotodeštrukcie rakovinových buniek produkciou reaktívnych skupín kyslíka (ROS) po aktivácii fotosenzitívnej látky svetlom o určitej vlnovej dĺžke. Terapeutický účinok PDT sa môže zlepšiť modifikáciou štandardného protokolu liečby napr. rozdelením celkovej svetelnej dávky na niekoľko iluminácií s pauzami tmy medzi frakciami svetla. V reoxygovanom tkanive sa tak zvýši tvorba ROS.

V našich experimentoch sme pozorovali významne zvýšenú proliferáciu a rezistenciu buniek HT-29 po frakcionácii svetla (1+11 J/cm²) s dlhšou pauzou tmy medzi dvoma svetelnými dávkami. Nízka svetelná dávka (1 J/cm²) nevyvoláva ireverzibilné zmeny v bunkách. Následovná dlhšia tmavá pauza (6 h) na rozdiel od 1h pauzy má za následok rezistenciu buniek na cytotoxický efekt druhej svetelnej dávky (11 J/cm²). Prvá subletálna fotoaktivácia nestačí na zvýšenie produkcie proteínov tepelného šoku dosiaľ považovaných za kľúčové molekuly vo fotorezistencii, ale postačuje na spustenie dráhy prežívania

sprostredkovanej nukleárnym transkripčným faktorom- κ B a anti-apoptickým členom Bcl-2 rodiny proteínov Mcl-1.

Táto štúdia bola uskutočnená za finančnej podpory agentúry APVV (projekt APVT-20-003704) a grantovej agentúry VEGA (projekt VEGA-1/0240/08).

INTRACELULÁRNÍ TRANSPORT POLYPROTEINU GAG MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU

P. GRZNÁROVÁ, J. LIPOV a T. RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6

Cieľom práce je vysvetliť reguláciu intracelulárneho transportu prekursoru štruktúrnych proteínov polyproteinu Gag Mason-Pfizerova opičieho viru (M-PMV). Samotný polyprotein Gag postačuje k vytvoreniu viriónov podobných častíc v cytoplazme transfekovaných buniek *in vitro*. Byla sledovaná lokalizácia jedného Gag divokého typu M-PMV, jedného fenotypovo zaujímavého mutantu R55FGag, ktorý na rozdiel od nemutovaného typu tvoriaceho častice v pericentriálnom priestore skladá častice až u cytoplazmy hostiteľskej bunky. Pro detekciu proteínu a zistenie jeho lokalizácie v bunkách bola použitá vysoce senzitivná metóda s použitím nefluoreskujúceho derivátu fluoresceínu FIASH-EDT₂, ktorý špecificky a s vysokou afinitou väže krátkou sekvenciou tzv. tetracyclineového tagu (TC) CCPGCC. Tak vzniká komplex, ktorý po excitácii príslušnou vlnovou dĺžkou emituje silný zelený fluorescenčný signál. Pro tento účel boli navrhnuté a pripravené konštrukty pro wtGag-TC a R55FGag-TC v expresnom vektore na bázi pDsRed1-N1. Pro overenie úspešnosti transfekcie bol ďalej navrhnutý a pripravený konštrukt pro DsRed-TC v expresnom vektore pDsRed1-N1, DsRed po excitácii emituje červený fluorescenčný signál. Všetmi konštrukty boli transfekované bunky COS-1. Lokalizácia výsledných proteínov Gag-TC bola sledovaná inverzným mikroskopom Olympus v bunkách fixovaných formaldehydom v závislosti na čase.

Tento projekt je financovaný z grantů KJB 501270701 a MSM 6046137305.

DVE FORMY TAZI: AKO VZNIKAJÚ A POTENCIÁLNE FUNKCIE

S. GUNIŠOVÁ^a, J. KRAMARA^b a E. TOMÁŠKA^a

*^aKatedra genetiky a ^bKatedra biochemie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovensko
stanislavagunisova@yahoo.com*

Protein Taz1 je esenciálnou súčasťou ochranného komplexu koncov chromozómov kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Počas expície v *E. coli* aj *in vitro*

translačnom systéme podmieňuje Taz1p tvorbu dvoch foriem: plnej dĺžky (Taz1p) a skrátenú verziu (Taz1p Δ C), ktorej chýba skoro celá Myb doména¹. Na rozdiel od oligoméru Taz1p šiškovitého tvaru, Taz1p Δ C vytvára filamenty neschopné väzby telomerickéj DNA. Analýza lyzátoov potvrdila výskyt dvoch foriem aj u *Sch. pombe*. *In silico* analýza TAZI RNA odhalila v mieste štiepenia vlásenkovú štruktúru, ktorá by mohla byť zodpovedná za tvorbu dvoch foriem Taz1p, buď na transkripčnej alebo translačnej úrovni. S cieľom zistiť potenciálne odlišné úlohy foriem Taz1p sme na transkripčnej i translačnej úrovni študovali reguláciu expície TAZI. Pro objasnenie mechanizmu ich vzniku sme pomocou cielenej mutagenézy začali vyšetřovať okolie TAZI RNA ohraničujúce kodón pro poslednú aminokyselinu skrátenej formy.

LITERATÚRA

1. Tomáška E., Willcox S., Slezáková J., Nosek J., Griffith J. D.: *J. Biol. Chem.* 279, 50764 (2004).

DIABETES A HYPERCHOLESTEROLÉMIA OVPLYVŇUJÚ EXPRESIU PROTEÍNOV ZAPOJENÝCH V PROCESE ISCHEMICKO-REPERFÚZNEHO POŠKODENIA MYOKARDU

ANNA HARČÁROVÁ, ADRIANA ADAMEOVÁ, PETER KRÉNEK a MAGDALÉNA KUŽELOVÁ

Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SR

Diabetes a hypercholesterolémia sú známe ako rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení. Experimentálne práce zaoberajúce sa vplyvom diabetu na ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu však priniesli nejednoznačné výsledky, podobne ako štúdium expície eNOS v podmienkach experimentálneho diabetu. Hypercholesterolémia prostredníctvom ovplyvnenia regulačného proteínu eNOS kaveolínu-1 zasahuje funkcie tohto enzýmu. Preto našim cieľom bolo zistiť, ako sa mení expícia proteínov eNOS a kaveolínu-1 a závažnosť ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu v podmienkach experimentálneho diabetu a hypercholesterolémie u potkanov. Expícia proteínov eNOS a kaveolínu-1 v ľavej komore myokardu a aorte bola stanovená metódou SDS-PAGE a Western Blot. Na sledovanie závažnosti ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu sme použili *in vivo* protokol zameraný na výskyt reperfúzných dysrytmii a určenie dysrytmického skóre. Zvýšenú expiciu eNOS a kaveolínu-1 sme zaznamenali v aorte diabeticko-hypercholesterolemických zvierat ($P < 0,05$), ale nie u diabetických zvierat. V ľavej komore myokardu nedošlo k významným zmenám expície sledovaných proteínov ani v jednej skupine experimentálnych zvierat. U diabeticko-hypercholesterolemických, ale nie u diabetických potkanov, sme zistili zvýšený výskyt závažných ventrikulárnych dysrytmii a zhoršenie dysrytmického skóre.

Táto práca vznikla za podpory grantov UK/46/2007 a VEGA 1/4296/07.

**SLEDOVANIE mRNA ABC-TRANSPORTÉROV
A APOPTOTICKÝCH BIELKOVÍN PRI ROZVOJI
LIEKOVEJ REZISTENCIE U PACIENTOV
S AKÚTNOU LEUKÉMIOU**

**JOZEF HATOK, EVA BABUŠÍKOVÁ,
MONIKA SIVOŇOVÁ, TATIANA MATÁKOVÁ,
JANA JUREČEKOVÁ a PETER RAČAY**

Ústav lekárskej biochémie, JLF UK, Malá Hora 4, 036 01
Martin, Slovensko
hatok@jfmed.uniba.sk

Na rozvoji rezistencie leukemických buniek voči chemoterapii sa podieľa viacero mechanizmov. Medzi najviac študované bielkoviny spojené s chemorezistenciou radíme ABC „ATP-binding cassette“ transportéry a apoptotické bielkoviny. V tejto práci sme pomocou RT-PCR určili expresiu niektorých ABC transportérov (P-gp, MRP a BCRP) a apoptotických bielkovín (p53, bax, bcl-2 and bcl-X) u leukemických buniek od pacientov s akútnou leukémiou (AL). Navyše sme v našej štúdií porovnávali úroveň mRNA apoptotických proteínov medzi leukemickými bunkami a normálnymi leukocytmi od zdravých jedincov. Zistili sme, že v leukemických bunkách od pacientov s AL boli signifikantne zvýšené hladiny mRNA p53 a bax bielkovín. Signifikantne zvýšenou hladinou mRNA bcl-X_L pri akútnej lymfoblastickej leukémii (ALL) poukazujeme na vzťah ALL buniek k rezistencii cestou p53-závislej apoptózy. Medzi jednotlivými AL pacientmi sme na transkripčnej úrovni pozorovali vysokú heterogénnosť P-gp hladín, ktorá však bola signifikantne vyššia u pacientov v relapse oproti pacientom s iniciačným ochorením. Expresia MRP bola v leukemických vzorkách konzistentnejšia, avšak rozdiely medzi stavom ochorenia sme nepozorovali. Hladiny expresie BCRP boli veľmi nízke, no signifikantne vyššie u pacientov v stave relapsu.

Objasnenie mechanizmu vzniku chemorezistencie môže do budúca viesť k výberu stratégií účinnej chemoterapie.

Podporené grantom Ministerstva školstva Slovenskej republiky: aAV/1106/2004.

**VLIV EXPRESE GENU FLO11 NA MORFOLOGII
KOLONIÍ *Saccharomyces cerevisiae***

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

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

Kolonie kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae* jsou obvykle nestrukturované, téměř hladké. Kmen $\Sigma 1278$ ale vytváří kolonie silně zvrásněné se vzhledem propletených provazců (střev) s volnými prostory mezi nimi. Rolí ve vytváření této morfologie by mohl hrát protein buněčné stěny

Flo11p, který se, jak bylo dříve popsáno podílí na buněčné adhezi a tvorbě pseudohyfl.

Práce je zaměřena na studium vlivu exprese genu *FLO11* na morfologii monoklonií haploidního kmene *S. cerevisiae* ΣS^h (cit.²), odvozeného od kmene $\Sigma 1278$, v závislosti na zdroji uhlíku a ploidii. Při kultivaci *S. cerevisiae* ΣS^h na nefermentovatelných zdrojích uhlíku byla morfologie kolonií silně zvrásněná a docházelo k tvorbě pseudohyfl. Na fermentovatelných zdrojích uhlíku, s výjimkou rafinosy a maltosy, byly kolonie hladké. Korelace s expresí genu *FLO11* byla sledována měřením fluorescence fúzního proteinu *FLO11*-GFP.

Dále byla hodnocena morfologie kolonií spor hybridy ΣS^h a kmene BY4742, tvořícího hladké kolonie. Intenzivně zvrásněné kolonie byly nalezeny pouze v případě haploidů párovacího typu MATa. Northern-blotting analýza prokázala korelaci mezi stupněm strukturovanosti kolonie a hladinou *FLO11* m-RNA.

Rovněž byla hodnocena morfologie kolonií spor hybridů s delecí genů *FLO8*, *MSS11*, *MSN1* a *TEC1*, které ovlivňují transkripci genu *FLO11*. Výsledky ukazují, že zvrásněné kolonie tvoří kmeny pouze v případě, jsou-li nepoškozeny geny *FLO8* a *MSS11*.

Práce byla podporována granty IAA500200506 a LC531.

LITERATURA

1. Lo W. S., Dranginis A. M.: J. Bacteriol. 178, 7144 (1996).
2. Vopálenská I., Hülková M., Janderová B., Palková Z.: Res. Microbiol. 156, 921 (2005).

IDENTIFICATION OF THE GENES FOR ML-DOMAIN CONTAINING PROTEIN, DER-P2-LIKE ALLERGEN AND TICK RECEPTOR FOR OSPA IN HARD TICK *Ixodes ricinus*: THEIR ROLE IN VECTOR-PATHOGEN INTERACTION

**JANA HORÁČKOVÁ, NATALIJA
RUDENKO, MARYNA GOLOVCHENKO,
and LIBOR GRUBHOFFER**

Faculty of Science, University of South Bohemia, and
Biology Centre AS CR, Institute of Parasitology, České
Budějovice, Czech Republic
janahora@seznam.cz

Castor bean tick (*Ixodes ricinus*) is the main vector of many pathogens in Europe, the best known are spirochetes *Borrelia burgdorferi* and tick borne encephalitis virus, causative agents of serious diseases in humans. Differential expression of many tick genes is regulated by blood feeding or pathogen invasion. We found few genes encoding for proteins involved in the molecular mechanism of vector-pathogen interaction.

Genes of Der-p2-like allergen and ML-domain containing protein, are members of group II of ML (MD-2-related lipid recognition) protein family. Members of this protein family are found in different organisms; all contain

ML domain with N-terminal signal peptide and six conserved cysteine residues. Exact function of these proteins is unknown but probably they play role in innate immunity reactions, or in lipid metabolism. Expression of the two tick ML proteins is induced by blood feeding.

A gene encoding tick receptor for OspA of *Borrelia burgdorferi* (TROSPA) was identified in the hard tick *Ixodes ricinus*. The gene and its protein product is known in black-legged tick, *I. scapularis*. TROSPA plays an important role in *B. burgdorferi* binding to tick's gut and its colonization. The exon/intron organization of the *I. ricinus* TROSPA was revealed. The gene contains an intron in similar position like that from *I. scapularis*. TROSPA proteins from *I. ricinus* and *I. scapularis* show 92% of similarity.

NOVÝ PROTEIN RHODANASOVÉHO TYPU U *Acidithiobacillus ferrooxidans* – FUNKČNÍ STUDIE

**JOSEF HOUSER^{a,b}, OLDŘICH JANICZEK^a
a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,b}**

^aÚstav biochemie a ^bNárodní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
houser@mail.muni.cz

Spotřeba barevných kovů ve světě neustále vzrůstá, stejně jako jejich cena. Tyto důvody vedou ke snaze získávat kovy stále efektivněji a s minimem nákladů. Jedním z nejvíce se rozšiřujících způsobů, jak toho dosáhnout, je využití bakterií v procesu takzvané biohydrometalurgie. Přestože za tímto účelem můžeme využít řadu bakterií, nejlépe prostudovaným a pravděpodobně také nejvíce zastoupeným druhem je extrémofilní *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Díky své schopnosti uvolňovat kovy z jejich sulfidických rud je stále častěji používána pro těžbu mědi, zinku či niklu, tímto způsobem však lze získat i takové kovy jako je uran či zlato. Za účelem dalšího zefektivnění celého procesu je třeba lépe poznat životní pochody této bakterie, a to na úrovni jednotlivých enzymů. A právě enzymy účastníci se metabolismu síry dosud nejsou prozkoumány na dostatečné úrovni.

Mimo mnoha enzymů katalyzujících redoxní děje spojené se sírou, nacházíme v organismu *A. ferrooxidans* také kyanid:thiosulfát sulfurtransferasy (též rhodanasy). Rhodanasy se vyskytují u zástupců všech druhů organismů, kde vykonávají rozličné funkce počínaje detoxifikací kyanidu či sulfanu, přes podíl na syntéze/opravě Fe-S klastrů až po účast na signálních drahách. V genomu *A. ferrooxidans* bylo dosud nalezeno celkem 8 genů pro pravděpodobně rhodanasy. Cílem této naší práce je charakterizace zástupce této skupiny – proteinu RHC. V tomto případě se jedná o jediný enzym v genomu této bakterie, který vedle rhodanasové domény obsahuje také doménu ankyrinovou. Vzhledem k tomu, že tato doména slouží pro interakci mezi značně rozdílnými enzymy, je vysoce pravděpodobné, že protein RHC hraje významnou roli v metabolismu. V dostupných literárních zdrojích navíc dosud není charakterizován jediný enzym obsahující obě domény –

rhodanasovou i ankyrinovou. Naše práce by tudíž mohla přinést mnohé nové poznatky nejen pro studium *A. ferrooxidans*.

Po počátečním bioinformatickém studiu genomu *A. ferrooxidans* (kmen ATCC 23270) byl gen pro RHC klonován a transformován do několika různých kmenů *E. coli*. Zde byla optimalizována exprese proteinu. Pro jeho získání byla zvolena izolace z inkluzních tělísek s následnou renaturací. Výsledkem je enzym vykazující rhodanasovou aktivitu. Následně byla provedena základní funkční analýza zahrnující mimo jiné stanovení pH a teplotního optima, katalytických konstant (k_{cat}) vůči oběma typickým substrátům a další vlastnosti. Spolu s plánovaným vyřešením struktury enzymu se nám nabízí možnost komplexního pochopení významu RHC pro životní cyklus průmyslově významné bakterie.

Projekt je podporován granty MŠMT (MSM0021622413) a GA ČR (525/08/0697).

IDENTIFIKACE HOMEBOXOVÝCH GENŮ V GENOMU A TRANSKRIPTOMU SLADKOVODNÍ MEDÚZY *Craspedacusta sowerbyi*

**MILUŠE HROUDOVÁ, ZDENĚK KREJČÍK,
JAKUB ŘÍDL, HYNEK STRNAD, ČESTMÍR VLČEK,
PETR VOJTA a VÁCLAV PAČES**

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

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

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

V rámci tohoto projektu byly v genomech žahavců *Hydra magnipapillata* (nezmar) a *Nematostella vectensis* (mořská sasanka) identifikovány a klasifikovány homeoboxové geny. Pro další studium u *Craspedacusta sowerbyi* byly vybrány některé méně časté a funkčně zajímavé rodiny homeoboxových genů. Metodou PCR s degenerovanými primery a následnou DNA sekvenací PCR produktů byly v genomu *Craspedacusta sowerbyi* identifikovány 3 geny patřící do rodiny POU a 6 genů rodiny SINE. Byla připravena a částečně sekvenována fosmidová genomová knihovna *Craspedacusta sowerbyi* za účelem

identifikace a analýzy homeoboxových a jiných genů zajímavých z hlediska fylogeneze a ontogeneze. V nedávné době jsme tento přístup rozšířili na BAC genomovou knihovnu a na identifikaci a sekvenování homeoboxových genů a jejich klastřů. Další část této práce spočívá ve studiu a porovnání transkriptomu *Craspedacusta sowerbyi*, *Tripedalia cystophora* (zástupce žahavců třídy *Cubozoa*) a některých dalších žahavců. Pro sekvenování genomové DNA a cDNA využíváme moderní sekvenační technologie, zejména pyrosekvenování na systémech GS20 a FLX.

Transkriptom dospělého jedince (medúzy) *Craspedacusta sowerbyi* obsahuje kolem šesti tisíc unikátních genů včetně 22 genů homeoboxových. Z porovnání počtu POU a SINE genů v genomu a transkriptomu vyplývá, že se jich do mRNA transkribuje dvě třetiny respektive polovina. Výsledkem sekvenování cDNA nižšího vývojového stádia (larvy) *Tripedalia cystophora* je více než šest tisíc unikátních genů včetně 16 genů homeoboxových. Byla provedena také částečná sekvenace cDNA z komplexního smyslového orgánu (rhopalia) *Tripedalia cystophora* a bylo nalezeno kolem devíti set genů. Projekt směřuje k identifikaci dalších homeoboxových genů, ke studiu exprese vybraných genů v tkáních žahavců metodou *in situ* hybridizace a komparativním analýzám žahavčích genomů a transkriptomů z hlediska kvality a kvantity homeoboxových genů a jiných transkripčních faktorů.

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

ÚLOHA PROTEINU AGR2 PŘI ENDOKRINNÍ TERAPII KARCINOMU PRSU

ROMAN HRSTKA, TAMARA ŠMERDOVÁ, RUDOLF NENUTIL a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Masarykův onkologický ústav, Oddělení onkologické a experimentální patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno hrstka@mou.cz

Karcinom prsu představuje nejčastější nádorové onemocnění diagnostikované u žen ve většině vyspělých zemí světa a podobně je tomu i v naší populaci. Přibližně u dvou třetin pacientek je prokázána přítomnost funkčních estrogenních receptorů (ER) a právě u těchto případů je vhodné indikovat antihormonální léčbu, která obecně představuje jednu z nejstarších forem molekulární terapie. V přímé souvislosti s expresí ER byl nedávno objeven i protein AGR2. Při následných analýzách bylo prokázáno, že se jedná o významný proliferativní faktor se schopností indukovat tvorbu metastáz.

Při studiu exprese AGR2 na úrovni mRNA i proteinu jsme prokázali významnou korelaci nejen exprese AGR2 s přítomností funkčních steroidních receptorů ale i s expresí cyklinu D1. Protože cyklin D1 je znám jako jeden z faktorů spojených se vznikem rezistence při léčbě tamoxifenem, byla analyzována exprese AGR2 v rámci odpovědi na působení

různými antihormonálními adjuvans. Při stanovení exprese AGR2 v nádorové buňce po působení tamoxifenu skutečně docházelo k nárůstu hladiny AGR2, naopak při podání aromatázových inhibitorů či fulvestrantu bylo možné pozorovat inhibici exprese tohoto proteinu.

Vzhledem k významné korelaci mezi expresí AGR2 a rezistencí k tamoxifenu u karcinomů prsu lze předpokládat zapojení tohoto proteinu do procesů spojených s některými nežádoucími účinky při podávání tamoxifenu, kdy může docházet k tvorbě karcinomu endometria a v řadě případů i ke vzniku rezistence spojené s relapsem onemocnění. Na základě statutu exprese proteinu AGR2, který jednoznačně vykazuje prognosticky negativní vlastnosti, se tedy nabízí možnost volby vhodnější terapie, která by neindukovala zvýšenou expresi tohoto proteinu.

Tato práce byla podporována z prostředků MŠMT LC06035 a MZ0MOU2005.

VLIV INHIBITORŮ KINAS NA AKTIVACI PROTEINU p53 PŘI POŠKOZENÍ DNA

PAVLA HUBLAROVÁ, ROMAN HRSTKA, JITKA HOLČÁKOVÁ, TAMARA ŠMERDOVÁ, SOŇA BABČANOVÁ a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno hublarova@mou.cz

Protein p53 hraje významnou roli při odpovědi buňky na poškození DNA. Vyvolává zástavu buněčného cyklu indukci exprese proteinu p21^{Waf1} nebo spouští apoptózu aktivací p53 závislých genů *PUMA*, *NOXA* aj. Aktivní úlohu v těchto procesech mají kinas ATM a ATR a jimi regulované kinas Chk1 a Chk2, které fosforylují p53 především na serinech 15 nebo 20. Cílem našeho projektu bylo nalezení vhodných kombinací inhibitorů těchto kinas a DNA poškozujících látek, cisplatinu a doxorubicinu, které by u nádorových buněk přednostně vyvolávaly apoptózu a nesměřovaly buňky do zástavy buněčného cyklu, což je obecně považováno za možnou příčinu vzniku rezistence buněk k daným látkám.

Experiment byl prováděn na buněčných nádorových liniích exprimujících wild-type p53 protein: linii MCF-7 odvozené z karcinomu prsu a linii ARN8 odvozené z maligního melanomu. Buněčné linie byly ovlivňovány po dobu 16 hodin inhibitorem ATM/ATR (CGK733) v koncentraci 5 μM a inhibitorem Chk2 (2-(4-(4-chlorofenoxyfenyl)-1H)-benzimidazol-5-carboxamid) v koncentraci 10 μM. Inhibitory kinas byly aplikovány v kombinaci s 0,5 μM doxorubicinem a 10 μM cisplatinou. Hladiny vybraných proteinů byly analyzovány pomocí imunoblottingu a výsledky následně potvrzovány metodou real-time PCR na úrovni mRNA.

Při studiu šesti kombinací inhibitorů a cytostatik byly zaznamenány zásadní rozdíly při použití jednotlivých inhibitorů a linií. Inhibitory Chk2 i ATM/ATR v kombinaci s oběma cytostatiky způsobovaly snížení hladiny funkčního

p53 a současně i hladin jeho závislých proteinů (p21^{Waf1}, MDM2) v porovnání s účinky samotných cytostatik. Při analýze posttranslačních modifikací proteinu p53 vyvolaných námi použitými látkami bylo prokázáno, že fosforylace na serinech 15 a 392 proteinu p53 ve většině případů odráží expresi p53-regulovaných genů kódujících p21^{Waf1} a MDM2. Vliv studovaných kinás na modulaci transkripční aktivity p53 byl ověřen analýzou hladin mRNA vybraných p53 regulovaných genů *p21^{Waf1}*, *MDM2*, *GADD45*, *PUMA*, *NOXA* a *BAX*. Byla potvrzena významná role funkčních kináz při regulaci transkripční aktivity p53 při poškození DNA.

Tato práce je podporována granty GA ČR 301/07/0490 a MŠMT LC06035.

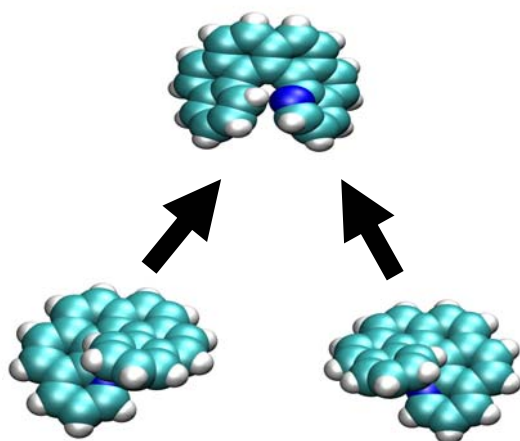
VLIV AZA-SUBSTITUCE NA STRUKTURU A ACIDBAZICKÉ VLASTNOSTI HELICENŮ

JANA CHOCHOLOUŠOVÁ, JAROSLAV VACEK, JIŘÍ MÍŠEK, IRENA G. STARÁ a IVO STARÝ

Ústav organické chemie a biochemie v.v.i., AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha

Heliceny přitahují pozornost díky svým zajímavým strukturám, spektrálním i fyzikálním vlastnostem. Tyto jejich vlastnosti byly již využity v enantioselektivní katalýze, samoskladbě a chirálním rozpoznávání.

V organické syntéze je velmi často důležité použití látek, které neracemizují při běžných reakčních podmínkách. Proto by bylo užitečné vědět, jaký vliv budou mít různé modifikace helicenuvého skeletu na racemizační bariéru dříve, než se pustíme do drahých a časově náročných experimentů.



Obř. 1. Přeřhod mezi (*M*) and (*P*) enantiomery 1-aza-[6]helicenu

Cílem této práce je poskytnout co nejpřesnější odhady racemizačních bariér pro skupinu aza-substituovaných helicenu¹ pomocí metod moderní počítačové chemie.

Semiempirické a *ab initio* výpočty s malým počtem básových funkcí, použité v dřívější studii² pro odhad racemizačních bariér helicenu a jejich metyl substituovaných analog poskytlly cenné informace, ačkoliv souhlas s experimentálními daty byl spíše kvalitativní a ne kvantitativní. Vezmeme-li v úvahu rychlý vývoj v oblasti výpočetní techniky, domníváme se, že je možné dosáhnout přesnějších výsledků, provedeme-li výpočty na vyšší úrovni, které jsou v současné době dostupné i pro větší molekulární systémy.

Předvedeme výpočty racemizačních bariér a acidobazických vlastností helicenu a azahelicenu pomocí metody funkcionálu hustoty (DFT) s funkcionálem B3LYP a cc-pVTZ bázi. Výsledky budou porovnány s dostupnými experimentálními daty

Grantová podpora: MŠMT (Centre for Biomolecules and Complex Molecular Systems, project LC512), Evropská komise (grant č. FP6-015847) a GA ČR (granty č. 203/06/1792 a 203/07/1664).

LITERATURA

- Míšek J., Teplý F., Stará I. G., Tichý M., Šaman D., Čiřařová I., Vojtíšek P., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.
- Janke R. H., Haufe G., Wurthwein E. U., Borkent J. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6031 (1996).

RŮZNÉ PŘÍSTUPY K PRODUKCI REKOMBINANTNÍHO LIDSKÉHO PEPTIDU S FARMAKOLOGICKÝM ÚČINKEM V BAKTERIÍCH *Escherichia coli*

ZUZANA CHRÁSTILOVÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^a, VLADIMÍR KRÁL^{a,b} a JOST LUDWIG^{c,d}

*^a Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^b Zentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10; ^c Ústav fyzikální biologie, Jihočeská univerzita, Zámek 136, 373 33 Nové Hřady; ^d Universität Bonn, IZMB / Molekulare Bioenergetik, Kirschallee 1, D-53115 Bonn
chrastiz@vscht.cz*

Terapeuticky aktivní peptidy a proteiny (často nazývané jako biofarmaceutika či bioléciva) reprezentují na trhu důležitou a rychle rostoucí skupinu léčiv. Biofarmaceutika zaujímají nezastupitelné místo pro léčbu řady onemocnění, v některých případech dokonce představují jedinou účinnou terapii. Významný podíl aplikací je v oblasti rakoviny, autoimunitních onemocnění, diabetes mellitus, anémie, nemocí spjatých s nahrazením chybného či chybějícího proteinu (např. lidského růstového hormonu) a dalších. Původně byly peptidy a proteiny s farmakologickým účinkem získávány z přírodních zdrojů, ale jejich produkce se postupně posunula k novým a efektivnějším biotechnologiím, jako jsou rekombinantní DNA technologie nebo hybridní technologie pro přípravu monoklonálních protilátek. Tyto nové techniky navíc umožňují úpravu

peptidů a proteinů „na míru“ tak, aby měly optimální farmakologické vlastnosti. Pro biotechnologickou produkci peptidů a proteinů s terapeutickým účinkem se nejčastěji využívají bakterie, kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky, rostlinné buňky a v poslední době se studuje i možnost využití transgenických rostlin a živočichů.

Cílem naší práce je připravit vhodný expresní systém pro produkci rekombinantního lidského peptidu, který může být použit pro farmaceutické účely. Obecně se produkce biologicky aktivních peptidů v bakteriích *Escherichia coli* bohužel setkává s nízkými výtěžky, a to především z důvodu intracelulární degradace peptidů a obtížné purifikace peptidů od kontaminujících proteinů. Ke zvýšení výtěžku ale může být využito několik metod. První metoda spočívá v použití fúzního proteinu, jako je např. glutathion-S-transferasa (GST), protein vázající maltosu (maltose binding protein, MBP) a další. Fúzní protein může být po úspěšné expresi oddělen od požadovaného peptidu proteolytickým štěpením díky specifické rozpoznávací sekvenci (často se používá např. enterokinasa nebo Faktor Xa). Další metoda reprezentuje tzv. genovou polymeraci, kdy je příslušný gen exprimován jako polymer a výsledný protein-polymer je následně štěpen na monomery. Poslední přístup zahrnuje expresi příslušného genu v bakteriálních kmelech, které vykazují nízkou proteolytickou aktivitu.

Připravili jsme několik expresních systémů využívajících výše zmíněné přístupy s cílem zvýšit výtěžek produkce peptidů pomocí bakterií *Escherichia coli* – použití fúzního proteinu, metodu genové polymerace a využití speciálních bakteriálních kmenů vykazujících nízkou proteolytickou aktivitu. Po úspěšné expresi byl hodnocen výtěžek, aktivita, ale i schůdnost provedení jednotlivých postupů s cílem navrhnout optimální systém poskytující vysoké výtěžky.

Tato práce byla sponzorována grantem FRVŠ G4 1069/2008.

MIKROVLNNĚ PODPOROVANÉ ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ PROTEINŮ

**FILIP KAFTAN^a, MILOSLAV ŠANDA^b
a JOSEF CVAČKA^b**

^a*Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2;*

^b*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6*

Mikrovlnně podporované enzymatické štěpení (MAPED) je v současné době velice nadějným a rozšiřujícím se přístupem a alternativou ke klasickému enzymatickému štěpení proteinů. Využití mikrovlnného záření, jak ukazují výsledky publikovaných studií zabývajících se touto problematikou, skýtá celou řadu výhod v porovnání s konvenčním přístupem, a to především významné zkrácení doby štěpení z klasických 8 hodin na 5–20 minut v závislosti na povaze experimentu, dále je to ve výsledku menší spotřeba enzymů a vzorků a na základě toho vyšší efektivita štěpení projevující se například (při analýze daného digestu prostřednictvím některého z uspořádání MS) lepším pokrytím sekvence štěpeného proteinu.

Mikrovlnné záření a jeho aplikace přitom není omezena pouze na samotnou proteolýzu, ale lze ho s úspěchem využít i v jednotlivých krocích elektroforetické separace a purifikace proteinů předcházející vlastní MAPED, a to například prostřednictvím gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Působením mikrovlnného záření se tedy konkrétně výrazně zkracují postupy redukce a alkylace vzorku proteinu, kdy je dokonce možné proces alkylace, vzhledem ke krátké době štěpení, zcela vynechat a tím i méně kontaminovat vzorek. Časově méně náročné jsou i kroky sorpce a desorpce barviva z gelu a stejně tak i finální extrakce vzniklých peptidů. Pro MAPED v gelu i roztoku je nejčastěji využívána karboxypeptidáza trypsin. Jednou z mnoha výhod trypsinu je fragmentace proteinu na peptidy o vhodné velikosti k následné MS analýze. Pouze výjimečně se pro MAPED používají proteasy jako Lys-C, Glu-C nebo α -chymotrypsin. Tato práce mapuje a optimalizuje podmínky MAPED pro Arg-C, Asp-N, Glu-C, Lys-C, chymotrypsin nebo pepsin. Optimalizace je prováděna na modelových proteinech jako je BSA, lysozym či ovalbumin a na reálných vzorcích proteinů.

MODULÁCIA METABOLIZMU FOSFOLIPIDOV POLYNEENASÝTENÝMI MASTNÝMI KYSELINAMI V NÁDOROVEJ TERAPII

**MARTIN KELLO, JAROMÍR MIKEŠ,
RASTISLAV JENDŽELOVSKÝ, JÁN KOVAČ
a PETER FEDOROČKO**

*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká
fakulta UPJŠ v Košiciach, Slovensko*

Aj napriek tomu, že sa dosiahol značný pokrok v poznaní mechanizmov karcinogenézy a aj v samotnej liečbe, stále sa hľadajú nové prístupy v snahe zvýšiť terapeutický efekt a znížiť riziko liečebného zásahu. Preto sa súčasne s klasickými postupmi (chemo- a rádioterapia) hľadajú nové prístupy k liečbe a prevencii nádorového procesu. Fotodynamická a nutričná terapia nádorov sa ukazujú ako jedny z rozvíjateľných a perspektívnych prístupov do budúcnosti. Nedávny výskum ukázal, že zásah špecifickými mastnými kyselinami na nádorom postihnutý organizmus znižuje rast tohto nádoru, indukuje apoptózu v nádorových bunkách a zvyšuje odozvu nádoru na chemoterapeutiká, čo môže byť sľubným prínosom využiteľným v súčasnej onkológii.

Progresívnym protinádorovým prostriedkom poslednej doby je hypericin – fotodynamicky aktívna látka, vyskytujúca sa ako pigment v rastlinách rodu *Hypericum sp.*, ktorý stimuluje produkciu rôznych reaktívnych foriem kyslíka, a tie sú následne zodpovedné za poškodenie bunky. Takto indukované poškodenie končí, za určitých podmienok, apoptózou ako primárnou formou bunkovej smrti.

V našej štúdií sme sledovali vplyv exogénnych mastných kyselín na moduláciu fosfolipidového metabolizmu v kombinácii s fotodynamickou terapiou na rôznych bunkových líniiach. Celkovo dochádza v sledovaných skupinách s kombinovanou terapiou k zvýšeniu citlivosti

nádorových buniek voči fotodynamickéj terapii a nárastu počtu apoptických buniek.

Štúdia bola uskutočnená za podpory grantov APVV (20-003704) a VEGA (1/0240/08).

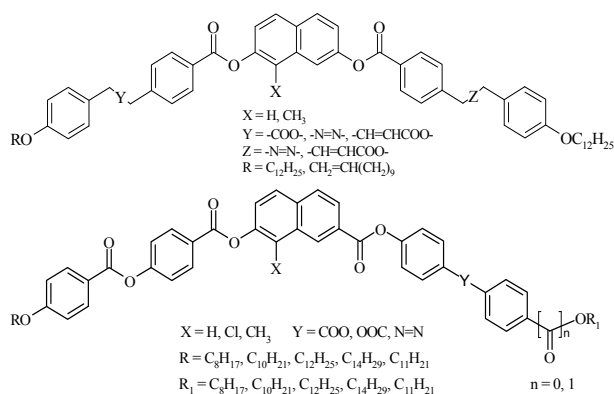
SYNTÉZA A STUDIUM VLIVU ORIENTACE A CHARAKTERU POLÁRNÍCH SPOJEK NA FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ

MICHAL KOHOUT^a, ADAM HENKE^a,
JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b
a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bFyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
michal.kohout@email.cz

Studium lomených kapalných krystalů stále patří mezi intenzivně se rozvíjející oblast materiálové chemie¹. Cílem prezentované práce bylo připravit nové typy nesymetrických lomených kapalných krystalů (Obr. 1) a studovat jejich mesomorfní chování pomocí DSC, studiem textur a rentgenostrukturní analýzou a dále pak fotochemickou isomerizací syntetizovaných derivátů.

Budou diskutovány rozdíly způsobené záměnou centrálního jádra, vliv substituce tohoto jádra, délky postranních řetězců a orientace esterových spojek na celkové změny v mesomorfním chování jednotlivých kapalných krystalů v připravených sériích nových látek. Bude diskutována možnost využití reverzibilního „přepínání“ mezi jednotlivými isomery v oblasti molekulárních přepínačů a vliv zastoupení jednotlivých isomerů na mesomorfní chování.



Obr. 1

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 202/05/0431), Ministerstvem školství,

mládeže a tělovýchovy (projekt MSM 6046137301 a OC176) a vnitřním grantem VŠCHT Praha 0015110.

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weisslog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 13, 2104 (2003).

DETEKCE SNP ASOCIOVANÝCH S IBD – GENETICKÝ ZÁKLAD PREVALENCE ONEMOCNĚNÍ, BEZPEČNOSTI A EFEKTIVITY FARMAKOTERAPIE

MICHAL KOLORZ^a, LADISLAVA BARTOŠOVÁ^{a*},
JAN HOŠEK^b a MILAN BARTOŠ^b

^a Ústav humánní farmakologie a toxikologie, ^b Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity, Brno 612 42, Palackého 1-3
bartosoval@vfu.cz

Mezi nespecifické střevní záněty (IBD) patří Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC). Onemocnění jsou chronická s dosud neznámou etiologií, a proto chybí i kauzální terapie. Cílem farmakoterapie je zastavit akutní průběh choroby a udržovat remisi příznaků. Vznik onemocnění je podmíněn souhrou genetických predispozic a faktorů prostředí. Mezi geny uváděné v souvislosti s CD a UC patří ICAM-1, NOD2, CCR5 (cit.^{1,2}). Vedle toho, řada tzv. „terapeutických“ genů ovlivňuje efektivitu farmakoterapie IBD. Jeden z nich kóduje thiopurin-S-methyltransferasu (TMPT), která inaktivuje imunosupresivně působící azathioprin (AZA). Polymorfismy v genu pro TMPT mají odezvu ve struktuře enzymu, což ovlivňuje jeho aktivitu³. Zejména substituce G238C, G460A a A719G jsou spojeny s výskytem vážných nežádoucích účinků terapie AZA - leukopenie. Aktivita mutantního enzymu je několikanásobně menší v porovnání se standardním proteinem. U pacientů nesoucích mutantní formy enzymu se akumulují aktivní metabolity AZA, které působí toxicky⁴. Z tohoto důvodu je u těchto jedinců potřeba optimalizovat léčebnou dávku s přihlédnutím k aktivitě enzymu. Dalším polymorfismem, u kterého je popsán vztah k bezpečnosti terapie imunosupresivy [AZA a methotrexátem (MTX)], je gen pro enzym methylenetetrahydrofolátreduktasu (MTHFR)⁵. Tento enzym se podílí na udržování buněčné zásoby folátů potřebných pro syntézu nukleotidů a také buněčných mechanismů reparace DNA. Nukleotidové substituce C677T a také A1298C vedou ke snížení aktivity enzymu, což se projevuje relativně vyšší účinností imunosupresiv⁶. Detekce přítomnosti mutací v terapeutických genech jsou vodítkem pro optimalizaci farmakoterapie a důležitým determinantem účinnosti a bezpečnosti léčby.

V této práci byla sledována souvislost mezi genetickými polymorfismy metabolických enzymů TPMT a MTHFR a výskytem nežádoucích účinků po podání AZA a MTX. Pro stanovení přítomnosti mutantních alel byly použity metody PCR-REA a real-time PCR. Výsledky byly vyhodnoceny χ^2 -testem.

V souboru bylo celkem 25 pacientů, kterým byl podáván AZA. Z těchto pacientů 10 projevovalo intoleranci po podání tohoto léčiva (leukopenie). Dva pacienti s leukopenií byli heterozygotní, jeden pro mutantní alelu TPMT*3B, druhý pro alelu TPMT*3A. Mezi pacienty s normální reakcí (n=15) nebyla nalezena žádná z mutantních alel. Prokázali jsme statistickou závislost mezi přítomností mutantního genu TPMT a výskytem leukopenie po podání AZA ($P=0,0437$). Mutace genu pro MTHFR se vyskytovaly u 8 jedinců s intolerancí na AZA. Jejich výskyt nebyl statisticky významný v porovnání s výskytem u pacientů s normální reakcí na léčivo. V souboru bylo také 10 pacientů, kterým byl podáván MTX. U dvou z nich byla popsána rezistence na léčivo, žádný neprojevoval známky intolerance a to i přesto, že v souboru se vyskytovali jedinci hetero- i homozygotní pro mutantní alelu MTHFR C677T i A1298C. Prokázali jsme statisticky významnou závislost mezi výskytem nežádoucích účinků farmakoterapie AZA a mutantním genotypem v genu pro enzymy TPMT. Naše studie neprokázala souvislost mezi polymorfismy v genu pro MTHFR a bezpečností farmakoterapie AZA a MTX. V této studii ovšem nebyly zohledněny některé faktory jako například současně podávání salicylátů, příjem folátů z potravy apod.^{3,6}

Vztah účinnosti a bezpečnosti farmakoterapie a výskytu polymorfismů v genech pro enzymy metabolizující léčiva je značně komplikovaný. I když řada studií prokázala vliv mutantního genu na hladinu aktivní látky, z klinických dat vyplývá, že kromě závislosti genotyp/fenotyp se zde uplatňuje řada dalších faktorů, které mohou vliv genetického defektu vyvážit.

LITERATURA

1. Yamamoto-Furusho J. K.: World J. Gastroenterol. 13, 5594 (2007).
2. Hošek J., Bartošová L., Svobodová J., Vechetová E., Kolorz M., Loučka P., Bartoš M.: Chem Listy 101, 438 (2007).
3. Shufeng Z.: Current Clinical Pharmacology 1, 119 (2006).
4. Relling M. V., Hancock M. L., Rivera G. K., Sandlund J. T., Ribeiro R. C., Krynetski E. Y., Pui C.-H., Evans W. E.: J. Natl Cancer Inst. 1999, 91.
5. Stocco G., Martelossi S., Sartor F., Toffoli G., Lionetti P., Barabino A., Fontana M., Decorti G., Bartoli F., Giraldi T., Ventura A.: Dig. Dis. Sci. 51, 474 (2006).
6. Ueland P. M.: Trends Pharm. Sci. 22, 195 (2001).

ANTIOXIDAČNÍ MECHANISMY *Brassica napus* PŘI OBRANNÝCH REAKCÍCH K *Leptosphaeria maculans*

**BARBORA KORBELOVÁ^{a,b}, JÓSZEF FODOR^c,
LENKA BURKETOVÁ^a a OLGA VALENTOVÁ^b**

^a Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6; ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 160 00 Praha 6; ^c Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Science, Budapest 1022, Herman Ottó út 15, Maďarsko
korbelova@ueb.cas.cz

Cílem této práce je studium antioxidačních mechanismů *Brassica napus* při obranných reakcích k houbovému patogenu *Leptosphaeria maculans*. *L. maculans* způsobující fomovou hnilobu je nejzávažnější a nejrozšířenější patogen rostlin rodu *Brassica*, zejména *B. napus* a *B. rapa*. Vzhledem k možným vlastním antioxidačním mechanismům patogena je v této práci použit elicitor izolovaný z virulentního izolátu *L. maculans*. Jako elicitor byl vybrán nativní filtrát média dle Friese po kultivaci *L. maculans*. Elicitor je infiltrován do děložních listů pomocí injekční stříkačky. Po ošetření rostlin elicitem dochází k nárůstu aktivity NADPHoxidasy, která produkuje superoxidový radikál. Následně dochází v buňce k nárůstu reaktivních forem kyslíku (ROS), které je nutno dále regulovat. Nejdůležitější regulační antioxidační mechanismy jsou enzymatická regulace ROS a neenzymatická regulace ROS. Mezi důležité antioxidační enzymy patří katalasa, guajakol dependentní peroxidasa, askorbátperoxidasa a glutathionreduktasa. Aktivita těchto enzymů je stanovena spektrofotometrickou metodou sledující nárůst produktu nebo pokles substrátu. Výsledky dokazují úlohu guajakol dependentní peroxidasy, askorbátperoxidasy a glutathionreduktasy v obraně *B. napus* a význam katalasy především v momentě prvního kontaktu rostliny s elicitem. Další, neenzymatický antioxidační mechanismus, je poměr oxidované a redukované formy kyseliny askorbové a glutathionu. Hladina kyseliny askorbové je stanovena pomocí enzymu askorbátoxidasy a hladina glutathionu je stanovena pomocí glutathionreduktasy. V rostlinách ošetřených elicitem dochází ke změně poměrů oxidované a redukované formy kyseliny askorbové a glutathionu. Elicitor odvozený z *L. maculans* indukuje akumulaci ROS a aktivaci antioxidačních mechanismů v děložních listech *B. napus*.

Tato práce je podporována granty MŠMT ME 928 a GA ČR 522/08/1581.

PARTICIPATION OF CYTOCHROMES P450 AND PEROXIDASES IN ACTIVATION METABOLISM OF THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN MICE *IN VIVO*

**V. KOTRBOVÁ^a, M. MOSEROVÁ^a, E. FREI^b,
and M. STIBOROVÁ^a**

^aDepartment of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; ^bDepartment of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg, BRD
verakotrbova@centrum.cz

Ellipticine is an alkaloid exhibiting significant antineoplastic activities. It is used in therapy of breast cancer and leukemia. Ellipticine forms covalent DNA adducts mediated by cytochromes P450 (CYPs) and peroxidases. We evaluated the role of hepatic and extra-hepatic metabolism of ellipticine, using the HRN (*H*epatic Cytochrome P450 *R*eductase *N*ull) mouse model, in which NADPH:CYP

reductase is deleted in hepatocytes, resulting in the loss of essentially all hepatic CYP functions.

The DNA adduct pattern generated by ellipticine in mice *in vivo* consisted of at least two adducts formed from 13-OH- and 12-OH-ellipticine. The highest total DNA adduct levels were found in the liver. Ellipticine-DNA adduct levels in the liver of HRN mice were up to 65% lower relative to WT mice. The ratios of ellipticine-DNA adducts in extra-hepatic organs between HRN and WT mice of up to 4.7 suggest that these organs can activate ellipticine and that more ellipticine is available in the circulation. When hepatic microsomes of both mouse strains were incubated with ellipticine, ellipticine-DNA adduct levels with WT microsomes were of up to 2.9-fold higher than those from HRN mice. The levels of individual metabolites formed by hepatic microsomes from both mouse lines were different; 9-OH-ellipticine levels were only one sixth, while the amounts of 13-OH- and 12-OH-ellipticine, were about one half in incubations with HRN microsomes compared with the levels in incubations with WT microsomes. The results found *in vitro* and *in vivo* demonstrate that both CYP1A or 3A and peroxidases participate in activation of ellipticine to reactive species forming DNA adducts in the mouse model used in this study.

Supported by the GACR (grants 203/06/0329 and 303/06/0928 and the Czech Ministry of Education (grants MSM 0021620808 and 1M4635608802 – Center of targeted therapeutics).

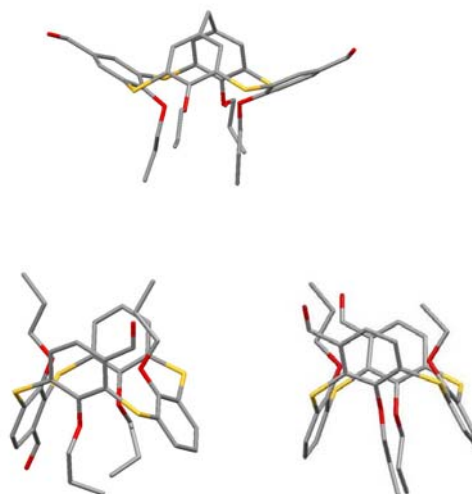
FORMYLACE DERIVÁTŮ (THIA)CALIX[4]ARENŮ

**ONDŘEJ KUNDRÁT^a, HANA DVORÁKOVÁ^b,
VÁCLAV EIGNER^c, MICHAELA POJAROVÁ^c,
IVANA CÍSAŘOVÁ^d, JAN BUDKA^a, IVAN STIBOR^a
a PAVEL LHOTÁK^a**

^aÚstav organické chemie, ^bLaboratoř NMR spektroskopie, ^cÚstav chemie pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^dKatedra anorganické chemie, PřF UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
kundrato@vscht.cz.

Thiacalix[4]areny substituované na horním okraji aldehydickými skupinami mohou sloužit jako cenné syntetické intermediáty při designu a syntéze složitějších supramolekulárních struktur. Tetraformyl-tetrapropoxythiacalixaren byl připraven reakcí odpovídajícího tetrabromderivátu s *tert*-BuLi v THF (-78 °C) a následné reakci s *N*-formylpiperidinem. Bohužel, tento postup nelze použít pro přípravu diformyl-dipropoxyderivátů. Protože přímá formylace skeletu thiacalixarenu nebyla dosud popsána, zaměřili jsme se na tento druh transformací. Byl proveden systematický výzkum přímé formylace thiacalix[4]arenu a jeho dipropoxy- a tetrapropoxyderivátů immobilizovaných ve třech konformacích, a to kónické, částečně kónické a 1,3-alternující. V závislosti na konformaci výchozího thiacalixarenu byla získána řada unikátních formylderivátů. Vůbec poprvé byly syntetizovány

deriváty s aldehydickými skupinami v *meta*-polohách a také zcela výjimečný thiacalixaren, přemostěný methylenovou spojkou. Výsledky různých přímých formylačních metod jako Vilsmeier-Haackova (PhN(CH₃)CHO, POCl₃), Duffova (urotropin, TFA) nebo Grossova metoda (Cl₂CHOCH₃, SnCl₄ nebo TiCl₄) budou diskutovány. Výsledky těchto reakcí v calixarenové chemii poskytují výhradně jen *para*-substituované aldehydy.



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

LITERATURA

1. Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T., Miyano S.: Chem. Rev. 106, 5291 (2006).
2. Lhotak P.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1675.
3. Himl M., Pojarova M., Stibor I., Sykora J., Lhotak P.: Tetrahedron Lett. 46, 461 (2005).

FERROCENOVÉ DIFOSFINY S PLANÁRNÍ CHIRALITOU – LIGANDY PRO ENANTIOSELEKTIVNÍ KATALÝZU

**MARTIN LAMAČ, IVANA CÍSAŘOVÁ
a PETR ŠTĚPNIČKA***

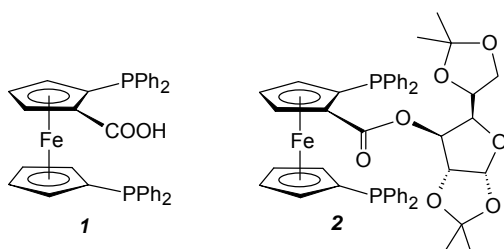
Univerzita Karlova v Praze, PřF, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2;
lamac@natur.cuni.cz, stepnic@natur.cuni.cz

V minulosti jsme popsali přípravu některých nových ferrocenových fosfinkarboxylových kyselin a jejich amidů, které se vyznačovaly přítomností planární a centrální chiralitě v molekule. Potenciál těchto nových sloučenin jako ligandů pro asymetrickou homogenní katalýzu byl demonstrován v palladiem katalyzované enantioselektivní

allylové alkyly, při které bylo dosaženo enantiomerních přebytků až 90 % (cit.^{1,2}).

Dalším krokem v objasňování role jednotlivých prvků chiralit a jejich vzájemného spolupůsobení ve vztahu ke katalytickým procesům je nyní příprava fosfinkarboxylových kyselin odvozených od dobře známého³ 1,1'-bis(difenylfosfino)-ferrocenu, dppf. První derivát tohoto typu, kyselina **1**, byla připravena (ve formě racemické směsi) z 1,1'-dibromferrocenu a následně rozdělena na enantiomery převedením na příslušný ester **2** s chirálním cukerným derivátem (diaceton-D-glukosou) a následnou chromatografickou separací diastereomerů.

Naše současná práce je zaměřena na zkoumání koordinačních vlastností racemického i opticky čistého ligandu (se zaměřením na komplexy palladnaté) a především na katalytické testy chirálních látek v enantioselektivní allylové alkyly.



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

LITERATURA

1. Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: Eur. J. Inorg. Chem. 2007, 2274.
2. Lamač M., Tauchman, J., Císařová I., Štěpnička P.: Organometallics 26, 5042 (2007).
3. Přehled chemie ligandu dppf viz: Gan K.-S., Hor T.S.A., in: *Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*, Chap. 1, p. 3 (Togni A., Hayashi T., Eds.) VCH, Weinheim 1995.

VLIV MURAMYLDIPEPTIDU A LIPOPOLY-SACHARIDU NA APOPTÓZU A EXPRESI CD14 BOVINNÍCH NEUTROFILŮ MLÉČNÉ ŽLÁZY *IN VITRO*

**TEREZA LANGROVÁ^{a,b}, PETR SLÁMA^{a,b},
MONIKA ZOUHAROVÁ^a, ZBYŠEK SLÁDEK^{a,b}
a DUŠAN RYŠÁNEK^a**

^aOddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00, Brno; ^bÚstav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno
xlangrov@node.mendelu.cz

Lipopolysacharid (LPS), složka buněčné stěny G- bakterií a muramyl-dipeptid (MDP), nejmenší strukturální jednotka

peptidoglykanu převážně G+ bakterií, mají schopnost vyvolat ve tkáni zánětlivou odpověď. Funkcí neutrofilních granulocytů (neutrofilů) je eliminace patogenních mikroorganismů během iniciální fáze akutního zánětu, kdy dochází k migraci těchto buněk z krve do postižené tkáně. Pro zachování homeostázy orgánu je nutná rezoluce, tedy ukončení zánětu. Proto podstupují neutrofilní programovanou buněčnou smrt, apoptózu. Apoptóza představuje fyziologický způsob zániku buňky, který je geneticky řízen, omezuje poškození zanícené tkáně a podporuje rezoluci zánětu. Rezoluce se realizuje fagocytózou apoptotických buněk makrofágy, tím se zabrání uvolňování histotoxického obsahu granulí mimo buňky. Prvním krokem eliminace apoptotických neutrofilů je jejich identifikace makrofágy. Pro rozpoznání apoptotických neutrofilů makrofágy jsou důležité biochemické změny probíhající na povrchu cytoplazmatické membrány buněk. Při studiu receptoru CD14 během zánětlivé odpovědi mléčné žlázy byl vysloven předpoklad o jeho aktivní účasti v rezoluci zánětu, zejména o úloze CD14 jako tzv. *eat me* signálu pro rozpoznání apoptotických neutrofilů makrofágy.

Cílem této studie bylo prokázat, do jaké míry se bakteriální činitelé vyvolávající zánětlivou odpověď podílejí na ovlivnění exprese CD14 na neutrofilech a na jejich životnosti.

Neutrofilny byly získány laváží mléčné žlázy během zánětlivé odpovědi. Laváže mléčné žlázy byly po zpracování inkubovány s MDP a LPS. Podíly apoptotických neutrofilů a podíly CD14+ neutrofilů pak byly detegovány průtokovou cytometrií po 30, 60, 120 a 300 minutách inkubace.

Během inkubace suspenze buněk docházelo k nárůstu podílu apoptotických neutrofilů. Jejich kultivace s MDP a LPS byla charakterizována pozvolnějším zvyšováním podílu apoptotických neutrofilů oproti kontrole.

Podíl CD14+ neutrofilů u kontroly se udržoval po sledovanou dobu na přibližně stejné úrovni. Po 30 minutách inkubace buněk s MDP byl podíl CD14+ neutrofilů oproti kontrole statisticky významně vyšší ($P < 0,01$), po 120 minutách inkubace buněk s MDP byl tento podíl opět statisticky významně vyšší ($P < 0,05$). Po inkubaci s LPS nebyly podíly CD14+ neutrofilů oproti kontrole statisticky významně odlišné. LPS je v předešlých studiích popsán jako činitel s vyšším potenciálem moderovat významné biologické vlastnosti neutrofilů. Toto zjištění je proto překvapující a nemáme dosud uspokojivé vysvětlení pro vyšší podíly CD14+ neutrofilů po inkubaci s MDP. Proto by měla být i nadále vlivu MDP a LPS na expresi CD14 věnována pozornost.

Porovnání podílů CD14+ neutrofilů během inkubace s MDP a LPS ukázalo, že exprese CD14 neutrofilů mléčné žlázy skotu je během inkubace s MDP časnější. Úloha receptoru CD14 během zánětlivé odpovědi je nezanedbatelná a bude nutné v jeho studiu pokračovat.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

MULTIPLE DEFECTS IN NEGATIVE REGULATION OF PKB/AKT PATHWAY SENSITIZE CANCER CELLS TO ANTI PROLIFERATIVE EFFECT OF NON STEROIDAL ANTI INFLAMMATORY DRUGS

E. LINCOVÁ^{a,b}, K. SOUČEK^a, A. STARŠÍCHOVÁ^{a,b}, Z. PERNICOVÁ^{a,b}, A. HAMPL^b, and A. KOZUBÍK^{a,b}

^aDepartment of Cytokinetics, Institute of Biophysics AS CR, Brno; ^bMasaryk University, Brno

Antitumorigenic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in prostate and colon cancer are well established. However, mechanisms driving these processes are not known in all details. It has been shown that some effects of NSAIDs are independent of inhibition of cyclooxygenase activity. Finding new biomolecular mechanisms associated with effects of NSAIDs will potentially lead to novel chemoprevention and treatment strategies.

The PKB/Akt pathway, promoting cellular transformation and survival, is frequently hyperactivated in human cancer. Studies investigating anti-cancer effects of NSAIDs have shown modulation of the PKB/Akt pathway. The inositoltrisphosphate phosphatases PTEN and SHIP2 are critical enzymes in the negative control of PKB/Akt.

In our study, we observed significant differences in sensitivity of prostate and colon cancer cell lines to antiproliferative effects of NSAIDs. PTEN and SHIP2 negative LNCaP cells were the most sensitive to these effects, as assessed by analysing the cell cycle profile and expression of regulating proteins. Knockdown of SHIP2 in PTEN negative cell lines resulted in higher sensitivity to antiproliferative effects of NSAIDs. Our data suggest that multiple defects in negative regulation of PKB/Akt pathway may contribute to increased sensitivity to antiproliferative effects of widely used drugs.

This work was supported by grant No. 204/07/0834 of Czech Science Foundation and by the Research Plan AVOZ50040507 of AS CR.

STRUKTURNĚ-AKTIVNÍ STUDIE FRAGMENTŮ PEPTIDU „COCAINE – AND AMPHETAMINE REGULATED TRANSCRIPT“

JANA MAIXNEROVÁ^{a,b}, DARJA BLOKEŠOVÁ^a, BLANKA ŽELEZNÁ^a a LENKA MALETÍNSKÁ^a

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^b1. Lékařská fakulta Univerzita Karlova, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2 maixnerova@uochb.cas.cz

Peptid CART (cocaine-and-amphetamine-regulated transcript) je peptidový neurotransmitter ovlivňující příjem potravy, sytost, stres, endokrinní regulace a jiné fyziologické procesy. Byl objeven před více než 10 lety, ale dosud se nepodařilo identifikovat a izolovat receptor. V současné době

jsme publikovali specifickou vazbu ¹²⁵I-CART(61-102) k feochromocytomálním buňkám PC12, nediferencovaným, diferencovaným na neurony pomocí nervového růstového faktoru a k buněčným membránám PC12 (cit.¹). V naší studii jsme prováděli kompetitivní vazebné experimenty s peptidy CART(61-102), CART(55-102) a di-jodovaným CART(61-102). Všechny tyto peptidy se vážaly k diferencovaným buňkám PC12 s vyšší afinitou než k nediferencovaným buňkám PC12 a to v nízkém nM rozmezí¹.

Dále byly syntetizovány fragmenty peptidu CART tak, aby odpovídaly strukturálním smyčkám mezi cysteiny CART(61-102). Bylo testováno 14 fragmentů peptidu CART, jejich vazebné afinity k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 byly² v rozmezí 10⁻⁵ – 10⁻⁴ M.

Po intracerebrovtrikulárním podání hladovým myším tyto fragmenty neinhibovaly příjem potravy ani při dávce 4 nmol/myš. Naše výsledky ukazují, že kompaktní struktura tří disulfidických můstků je nezbytná pro zachování biologické aktivity peptidu CART.

Tato práce je podporována grantem 303/05/0614 a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

LITERATURA

- Maletínská L., Maixnerová J., Matysková R., Haugvicová R., Sloncová E., Elbert T., Slaninová J., Železná B.: Eur. J. Pharmacol 559, 109 (2007).
- Maixnerová J., Hlaváček J., Blokesová D., Kowalczyk W., Elbert T., Sanda M., Blechová M., Železná B., Slaninová J., Maletínská L.: Peptides 28, 1945 (2007).

ROLE OF Srs2 And Mus81/MMS4 IN PROCESSING RECOMBINATION/REPLICATION INTERMEDIATES

PETRA MATULOVÁ, VERONIKA ALTMANNOVÁ, VICTORIA MARINI, and LUMÍR KREJČÍ

Laboratory of recombination and DNA repair, NCBR, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 62500 Brno matulova@chemi.muni.cz

Homologous recombination (HR) is a process widespread in nature and essential to maintain the integrity of the genome via repair of DNA double-strand breaks (DSBs).

Several models were proposed to understand the mechanism of double-strand break repair by HR, identify separate steps and role of the individual proteins involved.

The Mus81/MMS4 complex is a DNA structure-specific endonuclease involved in replication fork stability and DNA repair. It seems from genetic experiments that Mus81/MMS4 could interact with Srs2, a helicase which on one hand prevents untimely recombination and on the other hand is necessary for certain pathways of homologous recombination.

In our study, we confirmed the interaction between Mus81/MMS4 and Srs2. We then analyzed the stimulation of Mus81/MMS4 nuclease activity by Srs2 and we found out that this stimulation depends on the DNA substrate involved

in the reaction. Our experiments also indicate that the interaction between Mus81/MMS4 and Srs2 is specific.

REFERENCE

1. Fabre F., Chan A., Heyer W. D., Gangloff S.: Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 99, 16887 (2002).

PŘÍPRAVA TRANSGENNÍHO LNU PRO FYTOREMEDIACI TĚŽKÝCH KOVŮ

**JITKA NAJMANOVÁ^{a,b}, PAVEL KOTRBA^a,
MARTINA MACKOVÁ^{a,b} a TOMÁŠ MACEK^{b,a}**

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
najmanoj@vscht.cz

Znečištění půd a vod těžkými kovy, způsobeno převážně těžbou a spalováním fosilních paliv, je významný ekologický problém. Rostliny mohou být využity pro odstranění těžkých kovů jejich akumulací, stabilizací či chemickou přeměnou v procesu zvaném fytoremediace. Rostliny disponují několika obrannými mechanismy, které jim umožňují vypořádat se se stresem způsobeným těžkými kovy. Jeden z těchto mechanismů zahrnuje produkci neproteinových thiolů s vysokým obsahem cysteinu (NPTs), které jsou schopné navázat vysoké množství kovů a polokovů. Při obraně rostlin proti ohrožení z okolního prostředí hraje důležitou roli glutathion (GSH). Glutathion, nejen že tvoří substrát pro glutathion-S-transferasu, zajišťující neutralizaci potenciálně toxických xenobiotik¹, ale je také reduktantem pro dehydroaskorbát². Kromě toho je glutathion prekursorem fytochelatinů (PCs), peptidů, které vazbou s těžkými kovy pomáhají rostlině tolerovat a ukládat pro ni vysoce toxické, těžké kovy. Glutathion je syntetizován z jednotlivých aminokyselin ve dvou, po sobě jdoucích, ATP-dependentních reakcích. γ -glutamylcysteinsynthetasa (γ -ECS) katalyzuje tvorbu γ -glutamylcysteinu z cysteinu a glutamátu a glutathionsynthetasa (GS) připojení glycinu na výsledný produkt glutathion. Aktivita γ -ECS je regulována zpětnou vazbou glutathionu a je závislá na dostupnosti cysteinu, proto je reakce, katalyzovaná tímto enzymem, považována za limitující krok při absenci těžkých kovů. V přítomnosti těžkých kovů však regulace syntézy GSH zaznamenává výrazné změny. Kadmium podporuje transkripci genu pro γ -ECS a zároveň deaktivuje GS. Z toho plyne, že v přítomnosti Cd se může stát limitujícím krokem syntézy glutathionu a PCs reakce katalyzována GS.

Z výsledků předchozích studií se zdá být pravděpodobné, že se za podmínek stresu na regulaci podílí jak γ -ECS tak GS³. Cíl naší studie je exprimovat geny *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 pro γ -ECS a GSH2 pro GS ve lnu (*Linum usitatissimum*), který je jednoletou technickou rostlinou široce pěstovanou v mírném klimatickém pásmu, abychom získali rostlinu schopnou akumulovat kadmium a zároveň odolávat vyšším koncentracím Cd.

Kódující sekvence γ -ECS (GSH1) a GS (GSH2) byly klonovány z chromosomální DNA kvasinky *S. cerevisiae* W303 pomocí PCR, vloženy do plasmidu Impact Vector 1.1, a nukleotidová sekvence vložených fragmentů byla ověřena

sekvenací DNA. Vložené geny jsou ve výsledných plasmidech pIV1 and pIV2 ohraničeny Rubisco-promotorem (RbcS) z *Asteraceous chrysanthemum* a na 3'-konci RbcS-terminátorem transkripce. Obě transkripční jednotky budou dále klonovány do T-DNA agrobakteriálního plasmidu pro přenos do *L. usitatissimum*.

Autoři děkují grantové podpoře MŠMT 1M06030 a FRVŠ G4 1157/2008.

LITERATURA

1. Marrs K.: Plant Mol. Biol. 47, 127 (1996).
2. Foyer C. H., Haliwell B.: Planta 133, 21 (1976).
3. Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A., Weber S. U., Jouanin L., Terry N.: Plant Physiol. 121, 1169 (1999).

VÝVOJ A BIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE CYTOKININOVÝCH ANTAGONISTŮ PŮSOBÍCÍCH NA RECEPTOROVÉ ÚROVNI

**JAROSLAV NISLER, LUKÁŠ SPÍCHAL
a MIROSLAV STRNAD**

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a
ÚEB AVČR, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc
jaroslav.nisler@worldonline.cz

Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které mají zásadní význam pro vývoj a růst rostlin. V naší laboratoři byly připraveny nové cytokininové analogy, které kompetují s přirozenými cytokinininy ve vazebném místě jejich receptorů a inhibují *in vivo* efekt cytokininů. Tyto látky neaktivují cytokininovou signální dráhu a nevykazují vlastní cytokininovou aktivitu v klasických cytokininových biotestech. Nové anticytokinininy testujeme pomocí rovnovážné dialýzy ve vazebném testu s transgenním kmenem *E. coli*, který exprimuje cytokininové receptory AHK3 a AHK4 (cit.¹), dvou ze tří známých cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana*². Inhibice vnímání cytokininů je ověřována v *in vivo* testech s transgenními semenáčky *Arabidopsis*, které obsahují reportérový gen *P_{ARR5}::GUS* (cit.³). Anticytokininový efekt připravených látek byl testován také v klasických cytokininových biotestech (kalusový test, amarantový test a senescenční test s listy pšenice). Pozorovali jsme i zajímavé účinky na vývoj rostlin *Arabidopsis*, jako je např. stimulace růstu postranních kořenů nebo zkracování doby klíčení. Výsledky naznačují, že tyto látky by mohly najít využití jako modulatory endogenní hladiny cytokininů při studiu jejich fyziologických funkcí nebo také jako růstové regulátory se zajímavými zemědělskými aplikacemi. Naše laboratoř se dále zabývá vývojem nových cytokininových antagonistů s cílem dosáhnout vylepšených *in vivo* účinků.

Podpořeno granty MSM 6198959216, GA ČR 522/07/P197.

LITERATURA

1. Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling T.: Plant Cell Physiol. 2004, 1299.

2. Kakimoto T.: *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2001, 605.
3. Romanov G. A., Kieber J. J., Schmölling T.: *FEBS Lett.* 2002, 39.

STUDIUM KOMPLEXACÍ A SAMOSKLADBY AMIDŮ A AMINŮ ODVOZENÝCH OD ŽLUČOVÝCH A STEROIDNÍCH KYSELIN

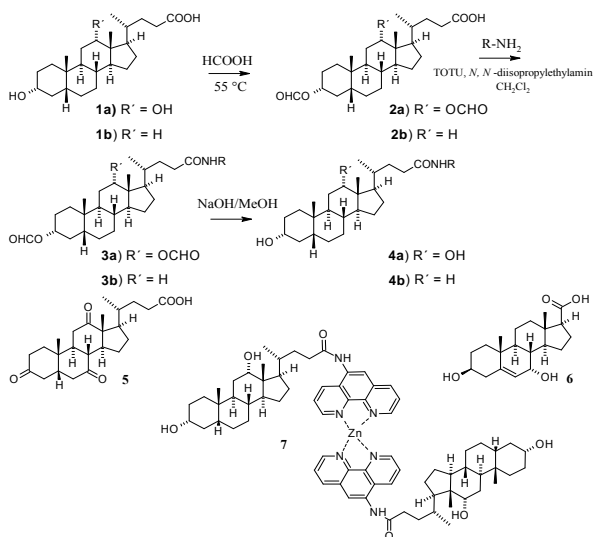
ZDENA NOVÁKOVÁ, BEATA JONŠTOVÁ
a PAVEL DRAŠAR

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
zdena.novakova@vscht.cz

Je známa schopnost žlučových kyselin, zejména substituovaných aromatickými donory, vytvářet gely z organických rozpouštědel a supramolekulární asociáty^{1,2}.

Cílem práce je syntéza amidů žlučových kyselin a jejich následné testování na potenciální gelační a agregační schopnosti. Popsaná příprava¹ byla optimalizována využitím kondenzačního činidla TOTU³. Reakce vycházejí z kyselin lithocholové **1b** a deoxycholové **1a**. Reakcí chráněných kyselin **2a**, **2b** s aminy byly získány amidy **3a**, **3b**, které byly odchráněny za vzniku hydroxylovaných amidů **4a**, **4b**. Analogické reakce byly prováděny i s kyselinou dehydrocholovou **5** a etienovou **6**.

Získané konjugáty jsou postupně testovány na potenciální samoskladné, gelotvorné vlastnosti a komplexaci s kovy (zinek, měď aj., cf. **7**) m.j. pomocí UV/VIS, RLS, CD, IČ spektroskopie⁴. Dále je zkoumána možnost redukce amidové vazby⁵ pomocí různých činidel ($[(\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{AlH}_2]\text{Na}$, LiAlH_4 , BH_3) a vlastnosti získaných aminů.



Práce byla podporována projekty MŠMT MSM604613705, 1P04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt a GA ČR 203/06/0006 a grantem NATO CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

1. Dukh M., Šaman D., Kroulík J., Černý I., Pouzar V., Král V., Drašar P.: *Tetrahedron* 59, 4069 (2003).
2. Virtanen E., Kolehmainen E.: *Eur. J. Org. Chem.* 16, 3385 (2004).
3. Ghossoub A., Lehn J. M.: *Chem. Commun.* 2005, 5763.
4. Štěpánek P., Dukh M., Šaman D., Moravcová J., Kniežo L., Monti D., Venanzi M., Mancini G., Drašar P.: *Org. Biomol. Chem.* 5, 960 (2007).
5. Pistia G.: *Carb. Res.* 328, 467 (2000).

CÍLENÉ ZABÍJENÍ RAKOVINNÝCH BUNĚK S PORUCHAMI V OPRAVĚ POŠKOZENÉ DNA POMOCÍ INHIBICE PARP-1

L. OPLUŠTILOVÁ^a, M. MISTRÍK^a a J. BÁRTEK^{a,b}

^aLaboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a Institut experimentální botaniky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc; ^bDánská společnost boje proti rakovině, Institut biologie rakoviny, Strandboulevarden 49, 2100 Kodaň, Dánsko

Defekty v procesech opravy poškozené DNA jsou častým znakem různých typů rakovin. Zasažení zbývajících, stále funkčních drah, na nichž je oprava DNA závislá, představuje strategii pro selektivní zabíjení takových buněk. Inhibice poly(ADP-ribose)polymerasy-1 (PARP-1), klíčového enzymu opravy jednořetězcových zlomů DNA, zabraňuje úspěšné opravě takových lézí. V průběhu buněčného cyklu jsou jednořetězcové zlomy převedeny na dvouřetězcové zlomy DNA. Buňky, které nejsou schopny vypořádat se s akumulovaným genotoxickým stresem, jsou odsouzeny k zastavení buněčného cyklu a apoptóze.

Cílem naší práce bylo otestovat genotypově různé rakovinné linie tlustého střeva a konečníku, ovarií, prsu, prostaty a pankreatu na stav BRCA1 a Mre11, Rad50, Nbs1 (MRN komplex) proteinů, nezbytných pro funkční opravu dvouřetězcových zlomů DNA cestou homologní rekombinace (HR). Následně jsme zjišťovali, zda deficience těchto proteinů souvisí s citlivostí na PARP-1 inhibitor. Naše výsledky ukazují výraznou citlivost na PARP-1 inhibitor u všech testovaných BRCA1 deficitních rakovinných linií. Kombinované defekty v BRCA1 a MRN komplexu ještě zvýšily buněčnou citlivost na PARP-1 inhibitor. Avšak buňky s pouhou deficiencí v MRN komplexu nereagovaly na PARP-1 inhibitor jednotně s vysokou citlivostí. Nicméně kombinované použití PARP-1 inhibitoru a látky poškozující DNA, camptothecinu, bylo pro tyto buňky destruktivní.

Zjištěná data naznačují, že rakovinné buňky s defektem v signalizaci poškození DNA a/nebo v HR mohou být úspěšně cíleny PARP-1 inhibitorem, ale s různým přístupem v závislosti na konkrétní poruše v HR nebo signalizaci poškození DNA. PARP-1 inhibitor jako samostatná droga představuje využitelnou terapeutickou strategii pro řadu rakovinných buněk nesoucích BRCA1 mutaci. Optimální zasažení buněk s defektem v MRN komplexu může na

druhou stranu vyžadovat kombinaci PARP-1 inhibitoru s dalším, DNA poškození indukujícím, chemoterapeutikem.

Projekt byl podpořen v rámci studentských zahraničních mobilit z Rozvojového projektu MŠMT a MSM 6198959216.

SELEKTIVNÍ TOXICITA OPTICKÝCH ISOMERŮ ALFA-HEXACHLORCYKLOHEXANU: (ANTI-)ANDROGENNÍ ÚČINEK

**NELA PAVLÍKOVÁ^a, PETR KLÁN^b
a LUDEK BLÁHA^a**

^aRECETOX, Masarykova univerzita, Kamenice 3, 625 00 Brno; ^bÚstav chemie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00, Brno
pavlikova@recetox.muni.cz

Hexachloreklochlohexan (HCH) je organochlorový pesticid, v minulosti široce používaný. Hlavní složky technické směsi HCH: α -HCH a β -HCH byly jako pesticid neúčinné, jsou však ze všech HCH isomerů nejvíce perzistentní, a proto se dodnes výrazně podílejí na kontaminaci životního prostředí. α -HCH jsou přisuzovány účinky neurotoxické a kancerogenní, nedávno byl popsán také jeho endokrinní disruptivní efekt (týkající se aktivity androgenního receptoru; AR). Přestože α -HCH má dvě enantiomerické formy, všechny toxikologické studie se u α -HCH vztahují pouze k racemátu 1:1. Tato studie jako první předkládá srovnání účinku racemátu α -HCH s jeho jednotlivými enantiomery. Separace enantiomerů byla provedena pomocí semi-preparativní HPLC a jejich (anti)androgenní efekt byl testován za použití buněk karcinomu prsu (linie MDA-kB2) stabilně transfekovaných genem pro luciferázu pod transkripční kontrolou androgeních receptorů. Dosavadní výsledky ukázaly významnou anti-androgenní aktivitu racemátu α -HCH (maximální efekty v nízkých mikromolárních koncentracích). Jednotlivé enantiomery se nám podařilo úspěšně separovat a jejich účinky na AR jsou aktuálně studovány.

Výzkum je podporován grantem INCHEMBIOL MSM 0021622412.

PROTEINOVÉ INŽENÝRSTVÍ ENZYMŮ: OPTIMALIZACE PŘÍSTUPOVÝCH CEST VEDOUČÍCH DO AKTIVNÍHO MÍSTA

**M. PAVLOVÁ^a, M. KLVÁŇA^a, P. DVOŘÁK^a,
R. CHALOUPKOVÁ^a, R. C. WADE^c, Y. NAGATA^b
a J. DAMBORSKÝ^a**

^aLoschmidtovy laboratoře, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno; ^bDepartment of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japonsko; ^cMolecular and Cellular Modeling Group, EML Research, Heidelberg, SRN
jiri@chemi.muni.cz; <http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/>

Vysoká perzistence některých syntetických látek může být způsobena jejich obtížnou biologickou rozložitelností, tedy chybějícím nebo nedostatečně výkonným enzymem nezbytným pro katalýzu kritického kroku biochemické dráhy. Toto platí zejména pro nízkomolekulární halogenované uhlovodíky, které po uvolnění do životního prostředí představují vážné riziko pro ekosystém a lidské zdraví. Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5) jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují klíčovou detoxifikační reakci halogenovaných uhlovodíků, jakou je hydrolytické štěpení vazby uhlík halogen na odpovídající alkoholy a halogenidové anionty. Díky této vlastnosti představují halogenalkandehalogenasy skupinu enzymů s velkým potenciálem pro využití v biodegradacích, bioremediacích a biosensingu. Přes širokou substrátovou specifitu halogenalkandehalogenas narážíme na problémy spojené s jejich nízkou aktivitou a stabilitou. Halogenalkandehalogenasy se tak stávají vhodným kandidátem pro proteinové inženýrství umožňující modifikovat katalytické vlastnosti enzymů cílenými změnami v jejich struktuře.

Cílem této práce bylo zvýšení katalytické účinnosti halogenalkandehalogenasy DhaA z půdní bakterie *Rhodococcus* sp. s vysoce perzistentními a toxickými sloučeninami 1,2,3-trichlorpropanem a 1,2-dichlorethanem. K návrhu mutací jsme použili semi-rationální přístup, který kombinuje racionální design s řízenou evolucí. Pomocí racionálního designu jsme identifikovali osm klíčových aminokyselin I135, A145, A172, C176, W141, V245, L246 a Y273, které tvoří stěny tunelů spojující povrch enzymu s jeho vnořeným aktivním místem. Tyto klíčové aminokyseliny byly mutovány místně cílenou mutagenezí a saturační mutagenezí. Mutantní knihovny čítající 5300 klonů byly biochemicky testovány na mikrotitračních destičkách a 51 pozitivních kandidátů bylo sekvenováno. Výsledky sekvenace potvrdily 26 mutantních variant, které byly dále detailně charakterizovány. Varianty DhaA obsahovaly ve většině případů substituce za velká aromatická rezidua. Specifické kombinace mutací ovlivňující přístupové cesty spojující aktivní místo DhaA s povrchem vedly k 26-ti násobnému zlepšení aktivity s 1,2,3-trichlorpropanem a 9-ti násobnému zlepšení aktivity s 1,2-dichlorethanem. Zvýšená aktivita je pravděpodobně způsobena prostorovým omezením přístupu molekul vody do aktivního místa DhaA vedoucí ke zvýšené tvorbě aktivovaného komplexu. U mutantních variant nesoucí změny v pozicích C176 a A172 došlo současně k výraznému zvýšení termostability, v některých kombinacích až o 19 °C. Pozorován byl rovněž významný posun v substrátových specifitách jednotlivých mutantních proteinů.

Výsledky naší studie ukazují na důležitou roli přístupových cest vedoucích do aktivního místa enzymu. Předpokládáme, že optimalizace přístupových cest může být jedním z obecných mechanismů adaptace enzymů na nové chemické sloučeniny uvolněné člověkem do životního prostředí, na zlepšení katalytické aktivity enzymů, jejich substrátové specifity a stability.

STUDIUM INTERAKCIÍ PROTEINU 14-3-3 POMOCÍ MS3D TECHNIKY

**KATEŘINA PEŠLOVÁ^{a,b}, PETR NOVÁK^b,
TOMÁŠ OBŠIL^c, PETR HODEK^a
a MIROSLAV ŠULC^{a,b}**

^aPřírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2; ^bMikrobiologický ústav AV ČR v.v.i. a ^cFyziologický ústav AV ČR v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Praha 4
peslova@biomed.cas.cz

Proteiny 14-3-3 patří mezi regulační proteiny účastníci se širokého okruhu biologických procesů interakcí s více než dvěma sty popsaných vazebných partnerů. Vazba do komplexu je ve většině případů podmíněna nejprve seskupením proteinů 14-3-3 do dimerů a následně rozpoznáváním vazebných motivů klientních molekul, které jsou fosforylovány¹. V každém roce se zvyšuje množství publikovaných strukturních modelů proteinových komplexů 14-3-3 s různými partnery, které jsou většinou získané technikami rentgenostrukturní analýzy nebo nukleární magnetické rezonance s vysokým rozlišením^{2,3}. Nedostatkem těchto technik je skutečnost, že získaná data mohou vzhledem k prostředí proteinu v krystalu či rozpouštědlech kompatibilních s NMR popisovat částečně arteficiální strukturu proteinu, která nemusí odpovídat přirozené konformaci *in vivo*. K ověření takových strukturních modelů a zejména pro studium flexibilních oblastí proteinů, které nejsou v modelech přesně definovány, bylo použito poměrně nové techniky MS3D, která kombinuje hmotnostně spektrometrickou analýzu (MS) proteinových komplexů po předchozím kovalentním zesílení interagujících partnerů v roztoku. Protože síťovací reakce probíhá ve vodných roztocích, výsledky získané hmotnostní spektrometrií mapují vždy strukturu proteinů za fyziologických podmínek. Pomocí tohoto přístupu jsme již upřesnili polohu aminokyselin účastnících se interakcí mezi podjednotkami dimeru 14-3-3 a prokázali jsme odlišnou konformaci N-terminální části v homodimeru 14-3-3zeta oproti publikovanému modelu (PDB: 1ib1).

Technikou MS3D byly nyní studovány interakce dimeru proteinu 14-3-3zeta s regulační doménou tyrosinhydroxylasy (TH1R) a nebo s doménou RGS (regulátor G-signálních proteinů). 1D-SDS PAGE produktů síťovací reakce s činidlem EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid) prokázala tvorbu kovalentních dimerických komplexů mezi 14-3-3zeta a TH1R a mezi 14-3-3zeta a RGS. Fosforylované analogy obou substrátů vykazují v souladu s literaturou vyšší afinitu k proteinu 14-3-3. Proteinové komplexy byly následně identifikovány MALDI-TOF MS analýzou, která jednoznačně potvrdila proteinové složení kovalentních komplexů. Pro přesnou identifikaci aminokyselin, které se účastní interakcí mezi oběma partnery v proteinových komplexech, byla použita technika LC-FTICR (Liquid Chromatography - Ion Cyclotron Resonance with Fourier Transformation).

Tato práce byla finančně podporována grantem GA ČR (303/06/0928), institucionálním záměrem AV0Z50200510 a výzkumnými centry MŠMT LC545 a LC7017.

LITERATURA

1. Shen Y. H., Godlewski J., Bronisz A., Zhu J., Comb M. J., Avruch J., Tzivion G.: *Mol. Biol. Cell.* 14, 4721 (2003).
2. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R. J., Fu H., Liddington R.: *Nature* 376, 191 (1995).
3. Obšil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S., Dydá F.: *Cell* 105, 257 (2001).

3D STOCHASTICKÝ MODEL VÁPNIKOVEJ SIGNALIZÁCIE V SRDCOVOM MYOCYTE

**PAVOL PETROVIČ,
ALEXANDRA ZAHRADNÍKOVÁ,
IVAN ZAHRADNÍK^b a IVAN VALENT^a**

^aKatedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava; ^bÚstav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovensko

Transdukcia informácie z bunkovej membrány (sarkolema) k myofibrilám, počas kontrakcie srdcového svalu, je sprostredkovaná prostredníctvom Ca^{2+} iónov. Akčný potenciál, vzniknutý v sínusovom uzle pravej predsene, depolarizuje bunkovú membránu v srdcovom myocyte, čo spôsobí prítok Ca^{2+} iónov z extracelulárnych zdrojov cez napäťovo závislé DHPR kanály do dyadickej priestoru. Zvýšenie koncentrácie Ca^{2+} tu indukuje otvorenie vápnikovo závislých ryanodínových receptorov (RyR) na membráne sarkoplazmatického retikula. Tento nelineárny proces sa nazýva vápnikom indukované uvoľnenie vápnika (CICR). Otvorenie RyR-ov spôsobí masívne uvoľnenie Ca^{2+} zo SR do cytoplazmy, čo vedie ku kontrakcii bunky. V prezentovanom modeli numericky simulujeme stochastickú dynamiku vráťkovania DHPR a RYR kanálov po depolarizácii sarkolemy v 3D priestore dyadickej štbiny, pričom sme použili Monte Carlo algoritmus¹. RyR-y sú spriahnuté v klastri o veľkosti 1-49 RyR-ov, vo vzájomnej vzdialenosti 28 nm medzi susednými RyR-mi. DHPR kanály sú náhodne distribuované na rovine vzdialenej 12 nm od membrány SR. Každý kanál je bodovým zdrojom Ca^{2+} iónov a interakcia medzi kanálmi je sprostredkovaná prostredníctvom difúzie Ca^{2+} iónov, ktorá je opísaná súborom časovo závislých parciálnych diferenciálnych rovníc (PDEs). Pri ich riešení sme použili numerický solver VLUGR3 (Vectorizable Local Uniform Grid Refinement²), čo nám umožnilo študovať priestorovú a časovú evolúciu koncentrácie Ca^{2+} , Mg^{2+} a ATP^{2-} v 3D priestore³.

Model ukázal postupné zosilnenie vápnikového prúdu zo SR (I_{SR}), ako odpoveď na spúšťači prúd s extracelulárneho prostredia. Po depolarizačnom pulze s výškou amplitúdy 0 mV nastalo v každej bunke zosilnenie z 76 pA na 3,9 nA (I_{SR}), kde doménu tvoril klastier 49 RyR-ov a 7 DHPR kanálov. I_{SR} dosiahol po depolarizácii membrány maximálnu

hodnotu za 4,5 ms a následně bol za 10 ms signifikantně redukováný na 0,6 nA, ako dôsledok Ca^{2+} inaktivácie RyR-ov. Tento jednoduchý model 3D model dobre reprezentuje experimentálne výsledky a komplexne zahrňuje podstatnú časť fyzikálnych, fyzikálochemických, fyziologických a biochemických procesov vedúcich ku kontrakcii bunky myokardu.

Táto práca bola podporená grantom Univerzity Komenského v Bratislave UK/139/2007, grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja 51-031104 a ESF FUNCDYB programom.

LITERATÚRA

1. Fall Ch. P., Marland E. S., Wagner J. M., Tyson J. J.: *Computational Cell Biology*, Springer 2002.
2. Blom J. G., Verwer J. G.: *A vectorizable adaptive grid solver for PDEs in 3D*. Rep. NM-R9319, CWI, Amsterdam 1993a.
3. Valent I., Zahradníková A., Pavelková J., Zahradník I.: *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 155 (2007).

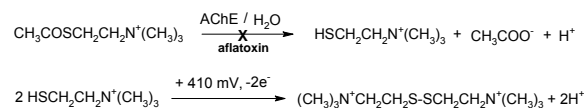
ELEKTROCHEMICKÉ BIOSENZORY PRO DETEKCI AFLATOXINŮ

MIROSLAV POHANKA^{a,b}, DANIEL JUN^{c,d}, KAMIL KUČA^{c,d} a PETR SKLÁDAL^b

^aCentrum biologické ochrany, 561 66 Těchonín; ^bKatedra biochemie, PřF Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ^cCentrum pokročilých studií a ^dKatedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
rau@atlas.cz

Elektrochemické biosenzory mohou být použity ke stanovení aflatoxinů v několika směrech. Pravděpodobně nejtradičnější způsob je založen na použití značených protilátek specifických proti aflatoxinu a konjugátu obsahujícímu aflatoxin kovalentně vázaný na vhodnou makromolekulu (nejčastěji albumin). Samotný formát měření je pak kompetitivní. V naší prezentované studii je zvolen odlišný přístup založený na schopnosti aflatoxinů inhibovat enzym acetylcholinesterasu (AChE). Mechanismus inhibice není sice ještě detailně popsán, ale předběžné studie poukazují na afinitu aflatoxinů k AChE na vyšší úrovni, než je uváděno u umělých inhibitorů: nervové paralytických látek a organofosfátových pesticidů.

V této studii popsaný biosenzor využívá AChE jako rekogniční složku a vlastní přítomnost aflatoxinů je detegována díky poklesu aktivity AChE. Schematické znázornění inhibice a elektrochemické sledování aktivity AChE je vyjádřeno pomocí dvou následujících reakčních rovnic:



První rovnice popisuje enzymově katalyzovanou hydrolyzu acetylthiocholinu, druhá pak oxidaci thiocholinu na povrchu pracovní elektrody. Proud získaný při oxidaci thiocholinu je výstupní veličinou.

Touto metodou byl stanoven aflatoxin B1 ve standardech jakož i v reálných vzorcích. Po optimalizaci bylo možno touto metodou stanovit aflatoxin B1 s limited detekce 4,8 ppb, když započítáme absolutní spotřebu vzorku 10 μl , je možno absolutně detegovat 4,8 pg aflatoxinu B1. K testované metodě byla vyvinuta i fotometrická varianta, kde elektrochemický proces je nahrazen reakcí s Ellmanovým činidlem. Při použití 96 jamkových titračních destiček byly zachovány dosažené analytické parametry. K praktickému ověření metody byly zvoleny potraviny kontaminované plísní *Aspergillus flavus* získané od Národní referenční laboratoře pro biomarkery mykotoxinů a mykotoxiny v potravinách a porovnány s HPLC analýzou.

Tato studie byla realizována v rámci grantového projektu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR: 2A-1TP1/009.

TESTOVÁNÍ VYBRANÝCH KOMPLEXŮ PŘECHODNÝCH KOVŮ JAKO CHEMICKÝCH NUKLEAS NA MODELU DSDNA

VERONIKA PRAŽÁKOVÁ^a, JÁN VANČO^b a MILAN BARTOŠ^a

^aÚstav přírodních léčiv, ^bÚstav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
bartos@geneproof.cz

Komplexy přechodných kovů jsou používány jak k analýze struktury DNA, tak k vývoji látek štěpících DNA, které jsou využitelné jako potenciální chemoterapeutika. Charakteristickým rysem, společným pro tyto komplexy je jejich vysoká afinita k dsDNA a přítomnost redoxně aktivního kovového iontu¹. Do těchto komplexů lze zařadit ligand nebo vhodný kov tak, aby výsledná struktura vyhovovala individuálnímu použití^{2,3}.

Předkládaná práce měla za cíl zhodnotit aktivitu vybraných komplexů kovů na základě chemicky indukovaného nukleasového účinku na struktury plasmidové dsDNA a porovnat aktivitu těchto látek bez a za přítomnosti askorbátu jako redukčního prostředí.

Byla testována nukleasová aktivita komplexů: Cu(sal- β -ala)(phen).H₂O (komplex 1), [Co(sal-gly)₂][Co(H₂O)₆] 2 H₂O (komplex 2) a [Cu(pyr- β -ala)(H₂O)] 2 H₂O (komplex 3), kde sal- β -ala a sal-gly jsou ligandy Schiffových bazí vzniklých kondenzací salicylaldehydu s β -alaninem, resp. glycinem, phen je doplňkový chelátový N-ligand 1,10-fenantrolin a pyr- β -ala dianion N-pyruviden- β -alaninu. Dále byly testovány železité komplexy odvozené od N,N'-bis(salicyliden)ethylendiaminu (salen) a N,N'-bis(salicyliden)-o-fenylendiaminu (saloph) s doplňkovými N-donorovými ligandy imidazolem (salen i) (komplex 4), benzimidazolem (salen bi) (komplex 5), benztriazolem (salen

bt) (komplex **6**) a triazolom (salen t, saloph t) (komplexy **7** a **8**) obecného složení [Fe(salen)L], resp. [Fe(saloph)(L)].

Nukleasová aktivita těchto sloučenin byla hodnocena na strukturách plasmidové DNA. Působením chemických nukleas docházelo ke štěpení řetězců původní nadšroubovicové dsDNA (CCC forma) na otevřenou cirkulární formu DNA (OC forma) nebo na formu lineární (L forma). Jednotlivé formy plasmidové DNA byly identifikovány elektroforézou v agarózovém gelu. V první sérii pokusů byla plasmidová DNA inkubována v prostředí peroxidu vodíku pouze s testovanými sloučeninami o koncentraci 24 μM a 120 μM . V dalších pokusech byl k této reakční směsi přidán i askorbát podporující reakci Fentonova typu.

Silná nukleasová aktivita byla zjištěna u komplexu **1** a to od 10 μM koncentrace; za přítomnosti askorbátu dokonce už od 3 μM koncentrace. Schopnost podobných komplexů s planárními doplňkovými ligandy oxidačně štěpit DNA prokázal i Reddy⁴. Jako chemická nukleasa působí i komplex **2** a komplexy **5** a **7** v koncentraci 24 μM a **8** ve 120 μM koncentraci. K rozštěpení řetězců DNA vedla také její inkubace se 120 μM roztoky komplexů **6**, **7** nebo **8** s askorbátem, který v tomto případě působil podle očekávání jako prooxidační činidlo, jak prokázali i jiní autoři⁵⁻⁷.

Zejména vysoká nukleasová aktivita, zjištěná u komplexu **1**, je jistým příslibem pro využití této látky jako potenciálního protinádorového léčiva, jehož účinek je založen na oxidačním štěpení DNA nádorových buněk⁸.

LITERATURA

1. Liu J., Lu T. B., Li H., Zhang Q. L., Ji L. N., Zhang T. X., Qu L.H., Zhou H.: *Trans. Met. Chem.* 27, 686 (2002).
2. Ma D.-L., Che C. M.: *Chem.-Eur. J.* 9, 6133 (2003).
3. Wang B.-d., Yang Z.-Y., Wang Q., Cai T.-k., Crewdson P.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1880 (2006).
4. Reddy P. A. N., Nethaji M., Chakravarty A. R.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2004, 1440.
5. Lee K.W., Lee H. J., Surh Y. J., Lee C. Y.: *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 1074 (2003).
6. Crott J. W., Fenech M.: *Carcinogenesis* 20, 1035 (1999).
7. Silvestri A., Giampaolo B., Giuseppe R., Maria Teresa Lo G., Salvatore T.: *J. Inorg. Biochem.* 98, 589 (2004).
8. Theophanides T., Anastassopoulou J.: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 57 (2002).

STUDIUM NEUROPATHOGENEZE KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

**DANIEL RŮŽEK^{a,b}, MARIE VANCOVÁ^{a,b},
HANA ŠTASTNÁ^a, JAN KOPECKÝ^{a,b}
a LIBOR GRUBHOFFER^{a,b}**

^a Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 37005 České Budějovice;

^b Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, Branišovská 31, 37005 České Budějovice
ruzekd@paru.cas.cz

Klíšťová encefalitida (KE) představuje významnou virovou neuroinfekci vyskytující se napříč prakticky celou Evropou a Asií. Původce tohoto onemocnění, virus klíšťové encefalitidy, je taxonomicky řazen společně s řadou dalších nebezpečných encefalických virů do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Mnoho zcela klíčových otázek spojených s biologií viru KE a patogenézí jim způsobovaného onemocnění zůstává stále nevyřešeno. V současné době existuje jen velmi málo experimentálních dat, jež by objasňovala složitou interakci viru KE s buňkami centrální nervové soustavy (CNS) hostitele, jeho průniku do mozku a šíření v rámci CNS.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium interakce viru KE s endotelovými buňkami hematoencefalické bariéry a buňkami neurálního původu. Experimenty byly provedeny na modelu dospělé laboratorní myši i v podmínkách *in vitro*. Kromě toho jsme sledovali roli hostitelského imunitního systému v patogenézí KE. Pozorovali jsme, že virus v okamžiku vrcholící virémie způsobuje desintegraci hematoencefalické bariéry, jejíž integrita se po odeznění virémie navrácí k normálu. Charakterizovali jsme řadu strukturálních a ultrastrukturálních změn neurálních buněk indukovaných virovou infekcí, včetně indukce apoptózy. Pomocí microarray technologie jsme studovali změny globální genové exprese v infikovaných buňkách. Na základě pokusů s myšmi nesoucími těžkou kombinovanou imunosupresi a díky technologii adoptivních přenosů imunity jsme zjistili, že k celkově fatálnímu výsledku infekce značnou měrou přispívají hostitelské CD8⁺ T-lymfocyty migrující do CNS, přičemž díky tomu KE vykazuje znaky imunopatologického onemocnění.

POLYMORFISMUS V PROMÓTOROVEJ OBLASTI PSA GÉNU U PACIENTOV S KARCINÓMOM PROSTATY A BENÍGNOU HYPERPLÁZIOU PROSTATY

**MONIKA SIVOŇOVÁ^a, TATIANA MATÁKOVÁ^a,
JOZEF HATOK^a, DUŠAN DOBROTA^a,
JÁN KLIMENT ml.^b a JÁN KLIMENT^b**

^a Ústav lekárskej biochémie, JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, ^b Urologická klinika MFN, Kollárova 2, 036 59 Martin

Prostatický špecifický antigén (PSA) je najvýznamnejším nádorovým markerom pre detekciu a sledovanie karcinómu prostaty. Gén kódujúci PSA je lokalizovaný na 19. chromozóme, obsahuje 6-kb promótor v 5' oblasti, a obsahuje ARE oblasti (Androgen-Responsive Elements), na ktoré sa viaže androgénový receptor, výsledkom čoho je regulácia expresie PSA génu. V promótorovej ARE-I oblasti v pozícii -158 od štartovacieho miesta transkripcie bol popísaný jednonukleotidový polymorfizmus (A/G). Cieľom našej štúdie bolo sledovanie potenciálneho funkčného významu daného polymorfizmu vo vzťahu ku karcinómu prostaty u 171 pacientov s karcinóm prostaty, 165 pacientov s benígnou hyperpláziou prostaty (BHP) a 75 zdravých

jedincov. Pacienti s BHP s G/G genotypom PSA génu majú 1.43 – vyššie riziko vzniku ochorenia v porovnaní s jedincami s genotypom A/A a A/G. V prípade pacientov s karcinómom prostaty sa nezistil žiaden vzťah medzi PSA polymorfizmom v pozícii -158, rizikom vzniku karcinómu prostaty a hladinami PSA v sére.

Podporené grantmi Ministerstva školstva Slovenskej republiky MVTS Bil/ČR/SR/UK/06 a AV 4/0013/05.

PRODUKCE IL-10 LEUKOCYTY MLÉČNÉ ŽLÁZY SKOTU PO STIMULACI LIPOPOLYSACHARIDEM A MURAMYLDIPEPTIDEM

PETR SLÁMA^{a,b}, MONIKA ZOUHAROVÁ^b, VLADIMÍR BABÁK^c, ZBYŠEK SLÁDEK^{a,b}, TEREZA LANGROVÁ^{a,b} a DUŠAN RYŠÁNEK^b

^aÚstav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bOddělení imunologie a ^cOddělení bezpečnosti potravin a krmiv, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno
xslama@node.mendelu.cz

Cytokiny jsou látky bílkovinné povahy, které kontrolují přežívání, růst, diferenciaci a funkce buněk. Jejich nejdůležitější funkcí je regulace imunitních procesů a zajištění homeostázy. Některé jsou zařazovány do skupiny prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α), jiné do skupiny cytokinů protizánětlivých (IL-1ra, TGF- β , IL-10). IL-10 (interleukin-10) je pleiotropní cytokin, který plní významné regulační funkce zprostředkované jeho působením na lymfoidní a myeloidní buňky. IL-10 má kromě protizánětlivého účinku rovněž další možnosti klinického využití. Např. při léčbě melanomů, při transplantacích, imunodeficiencích a parazitických infekcích.

Cílem práce bylo zjistit, zda lipopolysacharid (LPS) a muramyldipeptid (MDP), jako komponenty buněčné stěny G- a G+ bakterií, vyvolávají produkci bovinního IL-10.

Leukocyty získané po výplachu mléčné žlázy fyziologickým roztokem byly inkubovány jednu hodinu s LPS nebo MDP v *in vitro* podmínkách (RPMI medium, 37 °C a 5 % CO₂). Poté byla semikvantitativně zjišťována přítomnost IL-10 v získaném supernatantu sendvičovou metodou ELISA.

Při experimentech byl zjištěn nárůst produkce IL-10 při použití obou zmíněných imunogenních činitelů (LPS a MDP) oproti kontrolním vzorkům (leukocyty v RPMI mediu), přičemž vyšší produkce IL-10 byla zaznamenána při použití MDP.

Jak je z výsledků patrné, LPS a MDP vyvolávají produkci IL-10 u leukocytů mléčné žlázy skotu. Při dalším studiu tohoto cytokinu by měla být věnována pozornost tomu, jaké typy bovinních leukocytů se nejvíce podílejí na jeho produkci. Znalost prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů je důležitá z hlediska řízení průběhu zánětu. Při zánětu mléčné žlázy skotu může mít vhodná modulace tohoto procesu také nezanedbatelný ekonomický dopad.

Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

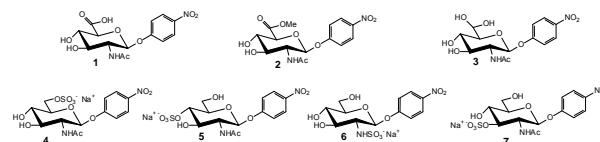
NEPŘIROZENÉ SUBSTRÁTY β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASY: SYNTÉZA NOVÝCH IMUNOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

KRISTÝNA SLÁMOVÁ^{a,b}, PAVLA BOJAROVÁ^a, KAREL KŘENEK^a, RADEK GAŽÁK^a, KAREL BEZOUŠKA^c, SPENCER J. WILLIAMS^d, MARTINA MACKOVÁ^b a VLADIMÍR KŘEN^a

^aCentrum biokatalýzy a biotransformací, MBÚ AV ČR, 142 20 Praha 4; ^bÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, 166 28 Praha 6; ^cKatedra biochemie, PŘF UK v Praze, 128 40 Praha 2; ^dBio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, 30 Flemington Rd, 3010 Parkville, Victoria, Australia
kristynaslamova@atlas.cz

Fungální β -N-acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) jsou glykosidasy s širokou substrátovou specifitou a velkým syntetickým potenciálem. Byly použity k syntéze nových N-acetylgluko- a galaktosaminidů s vysokou imunologickou aktivitou¹. Tyto látky se váží na CD69 receptor lidských přirozených tzv. zabíječských (NK) buněk, čímž se spustí signální kaskáda vedoucí k aktivaci cytotoxických mechanismů². Naše nejnovější výsledky ukazují, že vazba aktivačních molekul na receptor je zesílena přítomností negativně nabitě skupiny.

Byla připravena sada sedmi derivátů *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosidu (Obr. 1). Připravené glykosidy byly testovány jako ligandy aktivačních receptorů CD69. Zatímco přítomnost nabitě skupiny na C-6 (sulfát, karboxylát) přinesla značné zesílení vazby ligandu na receptor CD69 oproti nenabitěmu analogu, nabitá skupina na jiném uhlíku cukerného skeletu neumožňuje vazbu ligandu na receptor. Screening 24 fungálních β -N-acetylhexosaminidas z knihovny glykosidas Laboratoře biotransformací ukázal, že glykosid **3** byl obecně nejlépe akceptovaným substrátem, zatímco látky **2** a **5** nebyly štěpeny prakticky vůbec. V současné době je naším cílem připravit z těchto substrátů transglykosylaci s β -N-acetylhexosaminidasami nové vysoce imunoaktivní disacharidy.



Obr. 1. Modifikované substráty β -N-acetylhexosaminidas

Tato práce vznikla za podpory grantů IAA 400200503 a MŠMT LC06010.

LITERATURA

1. Fialová P., Namdjou D.-J., Ettrich R., Přikrylová V., Rauvolfová J., Křenek K., Elling L., Bezouška K., Křen V.: *Adv. Synth. Catal.* 347, 997 (2005).
2. Krist P., Herkommerová-Rajnochová E., Rauvolfová J., Semeňuk T., Vavrušková P., Pavlíček J., Bezouška K., Petruš L., Křen V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 11 (2001).

ŠTÚDIUM HOJENIA KOŽNÝCH RÁN A EXPRESIE GÉNOV SÚVISIACICH Z HOJENÍM NA MODELE DIABETU MELLITUS TYPU 2 - POTKANOMI ZUCKER DIABETIC FATTY (ZDF)

R. SLAVKOVSKÝ^{a,b}, R. KÖHLEROVÁ^b, M. HAJZLEROVÁ^b, A. JIROUTOVÁ^b, L. SOBOTKA^c, V. VELEBNÝ^a a J. KANTA^b

^aCPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč 401, 561 02, Dolní Dobrouč; ^bÚstav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Šimkova 870, Hradec Králové; ^cKlinika gerontologická a metabolická, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Komplikované diabetické defekty sú ťažko liečiteľné a často vedú k chronickým ranám či amputáciám dolných končatín. Patogenéza diabetických defektov je komplikovaná. Jedným z prístupov ako porozumieť tomuto fenoménu je aj štúdiom na experimentálnom zvieracom modeli. Nami volený model diabetes mellitus typu II (DM2), potkan ZDF, má geneticky podmienenú náchylnosť k vývoju výživou a obezitou indukovaného DM2 kvôli recesívnej mutácii leptínového receptora a vyznačuje sa mnohými parametrami zhodnými s DM2 u človeka. Cieľom tejto práce je zistiť, aké sú rozdiely v hojení rán a v expresii vybraných génov v rane medzi diabetickými a zdravými potkanmi ZDF.

Boli porovnané štyri skupiny zvierat: diabetické a zdravé, oboch pohlaví. Zvieratám boli na chrbte vytvorené cirkulárne excizné rany o priemere 2 cm, pravidelne bolo pozorované hojenie (0, 3, 5, 7, 10ty deň) a v intervale 10 dní po poškodení boli odobraté vzorky regenerujúceho sa tkaniva kvôli histologickým, biochemickým a molekulárne-genetickým analýzám.

V porovnaní s kontrolnými zvieratami u obeznych a diabetických zvierat bola pozorovaná obmedzená počiatočná kontrakcia rany. Výraznejšie rozdiely v hojení sme našli u samíc ako u samcov. Samice mali vyšší stupeň obezity, ale podstatne nižšiu hladinu glukózy oproti samcom. Diametrálne rozdielny je vzhľad rany, u diabetických je sprevádzaný nadmernou tvorbou chrasty a s vizuálnymi znakmi zápalu. Diabetické zvieratá majú tendenciu ranu hojiť reepitelizáciou, kontrolné zvieratá kontrakciou rany. Veľkosť jaziev je po zahojení zvýšená u samcov o 40% a u samíc až o 150% oproti kontrole. Technikou DNA array a realtime-RT-PCR sme v rane u samcov pozorovali zvýšenú expresiu prozápalového interleukínu 6, osteopontínu, rac2 podjednotky NADPH oxidázy a zníženú expresiu tropoelastínu. Obsah hydroxyprolínu, ukazovateľa kolagénu, bol výrazne znížený u samcov. Zvýšený zápal u diabetických

zvierat bol pozorovaný aj histologicky, kde bola pozorovaná zvýšená infiltrácia polymorfonukleárných buniek.

Ukazuje sa, že DM2 má vplyv na charakter a mechanizmus hojenia, choré zvieratá majú zvýšené známky zápalu, ktorý pravdepodobne spomaľuje hojenie. Z daných výsledkov sa nám ukazuje, že vysoký stupeň obezity má väčší vplyv na zhoršené hojenie ako vysoká hyperglykémia.

SPEKTROFLUOROMETRICKÁ ANALÝZA VÄZBY MITOCHONDRIÁLNEHO PROTEÍNU A TELOMÉROVÉHO OLIGONUKLEOTIDU

EVA SMREKOVÁ^a, MAREK ŠEBESTA^b, JOZEF NOSEK^b, LUBOMÍR TOMÁŠKA^c a IVAN VALENT^a

^aKatedra fyzikálnej a teoretickej chémie, ^bbiochémie a ^cgenetiky, Universita Komenského, PrF, Mlynská dolina CH-1 and B-1, 842 15 Bratislava, Slovensko

Prevedenie genetických informácií kódovaných DNA závisí aj od prídavných bunkových komponentov, vrátane veľkého počtu proteínov, ktoré regulujú ich vyššiu štruktúru, prístupnosť k DNA modifikujúcim komplexom a faktory, ktoré sa zúčastňujú na génovej expresii. Proteín viažúci sa na mitochondriálne teloméry (mtTBP) je vo väzbe s jednovláknovou DNA a vykazuje preferenciu väzby na 5' koncový telomérový zvyšok lineárnej mitochondriálnej DNA (mtDNA) kvasinky *Candida parapsilosis*^{1,2}. Pre detailnejšiu charakterizáciu vlastností DNA-väzby s proteínom mtTBP bol skúmaný prirodzený typ mtTBP a dva mutantné typy (mtTBP^{G28E} a mtTBP^{W61L}) s poslednými 51 nukleotidmi (TEL51) 5' telomérového zvyšku mtDNA kvasinky *C. parapsilosis*.

Väzba DNA a proteínov bola skúmaná pomocou techniky fluorescenčného zhášania vzhľadom na tzv. stacking interakciu tryptofánového zvyšku (Trp) s DNA špirálou³. Pre tieto merania boli použité spektrofotometre FloroLog FL3-11 a Shimadzu RF-5301 PC.

Výsledky poukázali na 30–45 % pokles intenzity fluorescenčného emisného maxima tryptofánu v 343 nm po 60 min inkubácie v pomere [DNA]/[mtTBP] = 0.6 pre prirodzený typ proteínu mt TBP a G28E mutantného proteínu pri koncentrácii 3×10^{-7} M. Mutantný typ W61L, ktorý obsahoval len jeden z dvoch Trp zvyškov, nevykazoval fluorescenčné zhášanie. Na rozdiel od HEPES pufru, PBS pufof spôsoboval posuny emisného maxima, čo poukazuje na dôležitosť výberu správneho pufru pre nasledujúce fluorescenčné experimenty.

Ďalší výskum bude zameraný na stanovenie asociačných konštánt a popis kinetiky interakcie pri rôznych podmienkach.

Táto práca je podporovaná Howard Hughes Medical Institute grant (55005622), the Fogarty International Research Collaboration Award (2-R03-TW005654-04A1), the Slovak grant agencies VEGA (1/2331/05, 1/3247/06) a APVT (20-001604, LPP-0164-06).

LITERATURA

1. Tomáška L., Nosek J., Fukuhara H.: J. Biol. Chem. 272, 3049 (1997).
2. Nosek J., Tomáška L., Pagáčová B., Fukuhara H.: J. Biol. Chem. 274, 8850 (1999).
3. Khamis M. I., Casasinet J. R., Maki A. H., Murphy J. B., Chase J. W.: J. Biol. Chem. 262, 10938 (1987).

NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION OF PROSTATE CANCER CELLS

**K. SOUČEK^a, Z. PERNICOVÁ^{a,b}, E. LINCOVÁ^{a,b},
A. STARŠIČOVÁ^{a,b}, and A. KOZUBÍK^{a,b},**

^aInstitute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno; ^bFaculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno
ksoucek@ibp.cz

Prostate cancer is one of the most common cancers among men especially in Western countries. Androgen-independent neuroendocrine cells are minor type of prostate epithelial cells found in both normal and cancer prostate tissue. It has been shown that these cells can contribute to the progression of prostate cancer. However, mechanism of this process is not fully understood. Our purpose was to find mechanism and characterize in more details neuroendocrine differentiation (NED) induced by prolonged cultivation of prostate cancer cell line in absence of androgens. NED was confirmed by observing of the protein and mRNA levels of well known neuroendocrine markers such as neuron-specific enolase and beta III tubulin. Interestingly, an increased level of specific NED markers was paralleled with changes in expression of other differentiation markers such as cytokeratin-18 and 19. Androgen ablation and NED induction led to the massive G₀/G₁ cell cycle arrest associated with downregulation of cyclin D1 and p21 protein expression and p27 upregulation. Our study indicates that pathway leading to NED of prostate cancer cells is complex process including also events characteristic for general epithelial differentiation.

This work was supported by grants GA CR No. 204/07/0834 and 310/07/0961 and by the Research Plan AV0Z50040507 and AV0Z50040702 of AS CR.

KMENOVÉ BUŇKY ZUBNÍ PULPY A PERIODONCIA

**T. SOUKUP^a, B. VÍŠEK^a, J. SUCHÁNEK^b,
R. IVANČAKOVÁ^b a J. MOKRÝ^a**

^aÚstav histologie a embryologie, UK v Praze, LF v Hradci Králové; ^bStomatologická klinika, UK v Praze, LF v Hradci Králové a FN Hradec Králové
soukupto@lfhk.cuni.cz

Zubní pulpa (ZP) stálé dentice se utváří ve 12. týdnu a ZP dočasně dentice dokonce již v 8. týdnu embryonálního vývoje. Od této doby je pomocí tvrdých zubní tkání ohraničena od okolního vaziva a zachovává si strukturu primitivního vaziva. Cílem naší práce je stanovení fenotypu, proliferativního a diferenciativního potenciálu, sledování morfologických změn a viability kmenových buněk zubní pulpy (KBZP) a kmenových buněk periodontia (PLSC) kultivovaných *in vitro*. V experimentu bylo použito celkem 10 linií KBZP izolovaných z 3. molárů a 1. premolárů a 1 linie PLSC. Buňky byly kultivovány v modifikovaném médiu pro MKB obohaceném o růstové faktory (EGF, PDGF), 2%FCS a ITS suplement. Pro fenotypizaci v průtokovém cytometru (Cell Lab Quanta) jsme použili primární protilátky značené fluorochromy FITC resp. PE. DNA analýza byla prováděna značením PI. Pro stanovení kvantitativních parametrů a viability buněk jsme použili přístroje Vi-Cell XR a Z2 Counter. Enzymatickou disociací celé zubní pulpy bylo izolováno v průměru 45 ± 6 (10 – 108) kmenových buněk. Tyto jsme kultivovali přes 50 populačních zdvojení (PD) v modifikovaném médiu pro MKB. Analýza ukázala zvýšení času potřebného pro zdvojení z původních 12–50 hodin pro prvních 43 PD na 60–90 hodin po překročení 55 PD. Viabilita kultivovaných buněk byla dlouhodobě 96 ± 3 %. V průběhu dlouhodobé kultivace KBZP jsme nepozorovali známky degenerace kultury či znaky spontánní diferenciacie buněk. DNA analýza prokázala 42 ± 5 % KBZP v S_G2 fázi buněčného cyklu. Fenotypická analýza KBZP subodontoblastického kompartmentu prokázala vysokou pozitivitu pro CD29, CD44, CD90, střední pozitivitu CD16 a nízkou pozitivitu pro CD11b, CD11c, CD49a,c,d,e, CD105, CD117, CD166. Fenotypická analýza KBZP perivaskulárního kompartmentu prokázala vysokou pozitivitu pro CD29, CD44, CD90, střední pozitivitu CD63, nízkou pozitivitu pro CD49a,c,d,e, CD105, CD146, CD166. KBZP ochotně diferencovaly v osteoblasty i chondroblasty a to jak při 2D kultivacích v monolayeru, tak při 3D kultivacích ve formě trojrozměrných sferoidů či na nosičích. Během dosavadních 15 pasáží jsme pro studovanou buněčnou populaci PLSC zjistili tyto parametry: průměr buněk 15 μm (SD = 4,55 %), 37 populačních zdvojení za uplynulých 45 dní (2. až 15. pasáž), průměrná viabilita 95,2 %, plating efficiency (15. pasáž) 78,2 %. Dle výsledků průtokové cytometrie námi kultivovaná populace PLSC vykazovala vysokou pozitivitu v mezenchymálních znacích CD29, CD44, CD73, CD105 a HLA1. Střední úroveň positivity vykazoval znak CD90. Nízkou expresi jsme zaznamenali u znaků CXCR4, CD235a a HLA2, negativní expresi vykazovali CCR7 a CD45. DNA analýza prokázala toto stabilní zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu: G₀/G₁ 64,1%, S 9,64%, G₂/M 18,68%. Z porovnání našich výsledků s dosud publikovanými pracemi vyplývá, že námi sledovaná populace PLSC vykazuje fenotyp odpovídající MKB. Jedná se o morfologicky homogenní populaci s výrazným proliferativním potenciálem a se stabilním projevem v kultivačních podmínkách *in vitro*. Do budoucna připravujeme další výzkum PLSC a to zejména v oblasti diferenciacie ve 2D kulturách a na trojrozměrných nosičích.

Kmenové buňky zubní pulpy a periodoncia představují vysoce potentní zdroj histokompatibilních kmenových buněk pro buněčnou terapii a to nejen onemocnění zubní pulpy a periodoncia. Jejich široký diferenciační potenciál otevírá cestu využití těchto buněk i v dalších medicínských oborech.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NR 9182-3/07.

PŘÍPRAVA, PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE NATIVNÍHO KOMPLEXU CFP-10/ESAT-6

**ONDŘEJ STANĚK^a, MARCELA ŠIMŠOVÁ^{a,b}
a PETER ŠEBO^a**

^aMikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Praha; ^bProteix s.r.o., Vestec

V poslední době opět stoupá počet lidí nakažených tuberkulózu a to nejen v rozvojových zemích třetího světa, ale v důsledku migrace také v zemích vyspělých. Kritickým bodem v boji proti této zákeřné nemoci je včasné a přesné odhalení latentní infekce bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI). V současné době pro tyto účely nejpoužívanější Tuberkulinový kožní test, založený na stimulaci PPD (Purified Protein Derivative), je však nepřesný díky křížovým reakcím s antigeny environmentálních mykobakterií a používání BCG vakcíny. Tento nedostatek se podařilo vyřešit u nových diagnostických testů použitím antigenů CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) a ESAT-6 (6-kDa early secreted antigenic target). Ty jsou kódovány v lokusu RD1 (Region of Difference) přítomném pouze u infekčních kmenů. Připravili jsme expresní vektory pro produkci volných rekombinantních antigenů CFP-10, ESAT-6 a rovněž jejich 1:1 komplexu CFP-10/ESAT-6 v buňkách *E. coli*. Použitím kmene *E. coli* ArcticExpress DE3, exprimujícího chaperony *Cpn60* a *Cpn10* a kultivace za nízké teploty (10 °C) se podařilo dosáhnout i produkce rozpustného proteinu ESAT-6 a předejit jeho precipitaci do inkluzních tělísek. Komplex CFP-10/ESAT-6 byl stabilizován již ko-produkcí antigenu CFP-10, který plnil funkci chaperonu ESAT-6. Při izolaci antigenů z biomasy bylo využito zahřátí cytoplazmatické frakce na 70 °C po dobu deseti minut s následnou precipitací denaturovaných balastních proteinů. Tvorba komplexu CFP-10/ESAT-6 izolovaného přímo z buněk, nebo připraveného smícháním byla ověřena pomocí nativní elektroforézy BN-PAGE a interakce protein-protein byly charakterizovány pomocí CD spektroskopie a rezonance povrchových plazmonů.

VYUŽITÍ DNA ČIPŮ V DIAGNOSTICE A VÝZKUMU LEUKÉMIÍ A LYMFOMŮ

**KATEŘINA STAŇO KOZUBÍK^a, BORIS TICHÝ^a,
PETR KUGLÍK^b, MICHAEL DOUBEK^a,
JIŘÍ MAYER^a a ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ^a**

^aCentrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno a LF MU, Černoplní

9, 625 00 Brno; ^b Oddělení lékařské genetiky, Černoplní 9, FN Brno a LF MU

Většina nádorů je provázána abnormalitami genomu nádorových buněk jako jsou bodové mutace, delece a amplifikace úseků DNA, případně přestavby chromozomů. Znalost těchto aberací má velký význam pro určení prognózy i výběr terapeutického plánu. Současně molekulárně biologické a cytogenetické postupy umožňující detekci jedné nebo několika změn současně jsou proto postupně nahrazovány novými komplexními technologiemi, například čipy DNA.

Čipy cílené na konkrétní onemocnění mohou upřesnit nejen diagnózu, ale i prognózu onemocnění a v neposlední řadě pomoci odhalit regulační dráhy vedoucí k maligní transformaci buňky. Na našem pracovišti využíváme DNA čipové technologie u hematologických onemocnění, zejména u chronické lymfocytární leukémie (CLL) a u lymfomů. Analyzujeme jak genomy nádorových buněk pomocí komparativní genomové hybridizace (array-CGH), tak i expresi genů. Obě technologie využívají oligonukleotidové čipy a přinášejí komplexní informace o změnách genomu a jeho expresi na úrovni DNA i RNA včetně mikroRNA.

Pro analýzu změn genomu nádorových buněk jsme využili CGH čipy (Human HD-CGH Microarray 4x44K) obsahující cca 44 000 oligonukleotidů o délce 60 bází navržených pro rovnoměrné pokrytí celého genomu. Analyzovali jsme vzorky pacientů s CLL, které byly cytogeneticky charakterizovány pomocí fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH). Chromosomální aberace byly nalezeny u téměř 90 % pacientů s B-CLL. Mezi nejvýznamnější změny a současně prognostické markery tohoto onemocnění patří delece 13q14 (geny RB1, miR-15 a miR-16), delece 11q22 (gen ATM), trizomie chromosomu 12 a delece/mutace nádorového supresoru TP53 v lokusu 17p13. Pomocí CGH čipů jsme detegovali všechny cytogenetické aberace zjištěné předchozím vyšetřením, navíc jsme našli množství nových, cíleným vyšetřením nezjištěných, změn genomu. Potenciálně velký význam má nově identifikovaný prognostický marker u CLL – krátká delece na cytobandu 22q11 u pacientů s velmi špatnou prognózou.

Metodu profilování genové exprese jsme využili především pro subklasifikaci lymfomů. Vytvořili jsme vlastní design expresního DNA čipu určeného pro odlišení folikulárního lymfomu od jiných maligních lymfomů a pro jeho molekulární a klinickou subklasifikaci. Na základě našich poznatků i recentně publikovaných prací jsme vybrali přibližně 3500 genů, u kterých se dá předpokládat rozdílná exprese u různých lymfomových subtypů. Podařilo se nám identifikovat rozdíly v genové expresi mezi jednotlivými typy lymfomů i mezi subtypy jednotlivých diagnóz. Výsledky ukazují na velký potenciál této metody při stanovení diagnózy a upřesnění prognózy lymfomů.

Čipové technologie mají v lékařské diagnostice nadějnou budoucnost. Umožňují velmi efektivní vyšetření celého genomu a transkriptomu z jediného vzorku DNA nebo RNA. Otevírají tak cestu k účinné a časně diagnostice, prognostice a následně léčbě rakoviny.

Práce na tomto projektu je podporována grantem IGA MZ ČR NR/9293-3.

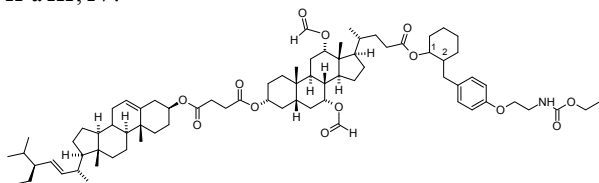
STEROIDNÍ DERIVÁTY BIOLOGICKY AKTIVNÍCH ALKOHOŮ

**HANA SYBODOVÁ^{a,b}, ZDENĚK WIMMER^b,
ONDŘEJ JURČEK^{a,b} a PAVEL DRAŠAR^a**

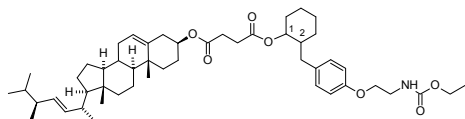
^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT, Technická 5, 160 28 Praha 6; ^b Isotopová laboratoř, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 14220 Praha 4
svobodoh@vscht.cz

Cílem práce bylo připravit steroidní deriváty biologicky aktivních alkoholů. Za modelové příklady biologicky aktivních látek jsme si zvolili syntetické bioanalogy juvenilních hormonů, tzv. juvenoidy¹, které ovlivňují morfologii a fyziologii vybraných druhů hmyzu. Použité postupy derivatizace lze ale aplikovat i na jiné biologicky aktivní alkoholy.

Již dříve byly připraveny sloučeniny juvenoidů s některými mastnými kyselinami² a sacharidy³. V této práci jsme k derivatizaci použili v přírodě se běžně vyskytující steroidy jako jsou cholová kyselina a stigmasterol. Zaměřili jsme se na přípravu konjugátů juvenoidů se steroidní součástí, která se skládá z jedné, či více steroidních jednotek, nicméně jedna z nich je vždy fytosterolem, např. struktury **I**, **II** a **III**, **IV**.



I 1,2-trans; **II** 1,2-cis



III 1,2-trans; **IV** 1,2-cis

Derivatizace juvenoidů se provádí za účelem cílené úpravy jejich fyzikálně-chemických vlastností. Předpokládá se, že tyto změny budou mít za následek usnadnění aplikace látky do organismu a zajistí její protražovaný účinek, neboť biologicky aktivní látka se bude působením hydrolytických enzymů a podmínek prostředí ze struktury postupně uvolňovat. Další výhodou připravených látek je skutečnost, že jejich odbouráváním nevznikají s výjimkou samotného juvenoidu žádné toxické produkty. Získané struktury navíc představují zajímavé stavební bloky pro výstavbu supramolekul.

Připravené deriváty je možné považovat za aplikační formy analogů juvenilních hormonů a budou testovány na vybraných druzích hmyzu.

Práce vznikla za finanční podpory projektu 2B06024 (NPV II, MŠMT) a výzkumného záměru MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Wimmer Z., Rejzek M., Zarevúcka M., Kuldová K., Hrdý I., Hrdý V., Němec V., Romaňuk M.: *J. Chem. Ecol.* 23, 605 (1997).
2. Wimmer Z., Šaman D., Kuldová J., Hrdý I., Bennetová B.: *Bioorg. Med. Chem.* 10, 1305 (2002).
3. Wimmer Z., Pechová L., Sile L., Šaman D., Jedlička P., Wimmerová M., Kolehmainen E.: *Bioorg. Med. Chem.* 15, 7126 (2007).

EXPRESNÍ PROFILOVÁNÍ SPINOCELULÁRNÍCH KARCINOMŮ V OBLASTI HLAVY A KRKU

JANA ŠÁCHOVÁ^{a,b}, ZDENĚK ČADA^c, MICHAL KOLÁŘ^a, LUKÁŠ LACINA^c, JAN PAČES^a, KAREL SMETANA^c, HÝNEK STRNAD^a, ČESTMÍR VLČEK^a a VÁCLAV PAČES^a

^a Ústav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, ^c Anatomický ústav 1. lékařské fakulty UK, U nemocnice 3, 128 00 Praha 2
sachovaj@img.cas.cz

Náš projekt je zaměřen na identifikaci specifických markerů v nádorové tkáni s možností aplikace v medicínské diagnostice. Spinoceleulární karcinomy hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) jsou zhoubné epiteliální novotvary vznikající komplexním procesem maligní transformace buněk epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému. Jsou charakterizovány značnou lokální agresivitou, častými recidivami a vysokou frekvencí výskytu mnohočetných nádorů. HNSCC tvoří 85–90 % všech zhoubných nádorů hlavy a krku. Každým rokem je celosvětově registrováno 500 000 nových případů HNSCC, což je řadí na 5. místo v četnosti zhoubných nádorů člověka. Nejčastěji se setkáváme s postižením dutiny ústní včetně jazyka, hltanu a hrtanu. Klasická léčba těchto nádorů se skládá z operativního zákroku v kombinaci s radioterapií a chemoterapií.

Rychlý rozvoj čipových technologií v posledních letech umožnil paralelní analýzu exprese až několika desítek tisíc genů zároveň v jediném experimentu, což představuje silný nástroj pro onkologický výzkum. Pomocí mikročipového výzkumu lidského transkriptomu byly objeveny nové diagnostické a prognostické markery.

Výchozím materiálem pro naše experimenty je nádorová tkáň, tkáň přilehlá k nádorové a tkáň odpovídající histologicky normální zdravé tkáni získaná z operací spinoceleulárních karcinomů. Z důvodů heterogenity HNSCC využíváme laserové záchytné mikrodisekce (LCM), což je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk z tkáňového řezu pro jejich následnou molekulární analýzu. Ze vzorků izolujeme celkovou RNA pomocí RNeasy Micro kitu. Získanou RNA následně spektrofotometricky kvantifikujeme. Vedle koncentrace RNA posuzujeme i její čistotu. Integrita RNA je oěřována pomocí Agilent Bioanalyzeru 2100 a její míra je vyjádřena jako hodnota RIN (RNA Integrity Number). Hodnoty RIN se

výrazně liší pro vzorky získané po disekci a bez disekce, tedy samotné tkáňové řezy. Zkoumali jsme proto vliv disekce na integritu RNA. Vzorky s dostatečnou koncentrací a integritou RNA byly připraveny pro lineární amplifikaci, reakci značení a následnou hybridizaci na čipy. Pro detekci odpovídající sady genů používáme čipy Illumina a Affymetrix. Následně porovnáваме expresní profily nádorové a normální tkáň. Všechny výchozí údaje (pacienti, diagnózy, histologie) i následně získaná data (LCM, izolace RNA, hybridizace aj.) jsou shromažďována v databázi.

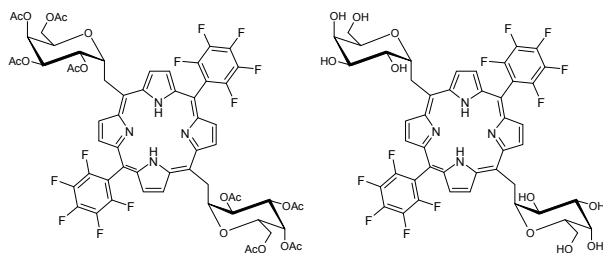
Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT 1M6837805002 (Center for Applied Genomics), MŠMT NPVII-2B06106 a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

PŘÍPRAVA A AGREGACE PORFYRINŮ SUBSTITUOVANÝCH V MESO POLOZE „SACHARIDOVÝMI“ SUBSTITUENTY

ONDŘEJ ŠIMÁK^a, JAKUB KAMINSKÝ^b
a PAVEL DRAŠAR^a

^aÚstav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha; Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR vvi, Flemingovo náměstí 2, 166 10, Praha 6
Ondrej.Simak@vscht.cz

Sloučeniny, ve kterých je aktivní struktura (farmakofor, chromofor ...) spojena s vektorem typu peptidového, oligonukleotidového, či sacharidového¹ segmentu, vzbuzují stále větší zájem. Použití chirálního polárního vektoru odvozeného od struktury sacharidu předurčuje takovou supramolekulární strukturu jako možný prostředek pro molekulární rozpoznávání v polárním (např. vodném) prostředí. Podobné sloučeniny, odvozené od porfyriu, jsou díky svým unikátním vlastnostem studovány mimo jiné i jako senzibilizátory pro fotodynamickou terapii či pro silné interakce s DNA a nukleotidy².



Byly připraveny konjugáty se spojením porfyriu-sacharid, ve kterých je cukerný skelet připojen k makrocyklu v meso poloze pomocí robustní, avšak flexibilní C-C vazby, která je na rozdíl od klasické O-glykosidické vazby odolná vůči hydrolytickému, potažmo enzymovému štěpení. Pro jejich přípravu byla využita cesta založená na jejich postupné výstavbě z dipyrrolových prekurzorů.

Změny optických vlastností způsobené agregací připravených porfyriu ve větší celky byly zkoumány

UV/VIS a fluorescenční spektroskopii a díky indukci chiralit v agregátech i pomocí cirkulárního dichroismu. Interpretaci získaných spekter s pomocí metod výpočetní chemie (zejména DFT) byl studován způsob skládání molekul v agregátech a jejich charakter.

Práce byla podporována projekty MŠMT MSM6046137305, 1P04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt a GA ČR 203/06/0006 a grantem NATO CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

1. Mikata Y., Ouchi Y., Tabata K., Ogura S.-I., Okura I., Ono H., Yano S.: *Tetrahedron Lett.* 8, 3007 (1998).
2. Sirish M., Schneider H.-J.: *Chem. Commun.* 2000, 23.

ŠTRUKTÚRA Na₃AlF₆-Fe₂O₃ A Na₃AlF₆-FeO TAVENÍN: VIAC-JADROVÉ ŠTÚDIUM POMOCOU VYSOKOTEPLOTNEJ NMR TECHNIKY

FRANTIŠEK ŠIMKO^a, CATHERINE BESSADA^b,
AIDAR RAKHMATOUILLINE^b, VLADIMÍR DANĚK^a
a MIROSLAV BOČA^a

^aÚstav anorganické chémie, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 36 Bratislava; ^bCentre de Recherches sur les Matériaux à Haute Température CNRS, 1D av. de la Recherche Scientifique, 450 71 Orléans, Francúzsko

Uvedené sústavy sa skúmali v rámci výskumu nečistôt, prítomných v procese elektrolytickej výroby hliníka Hall-Héroultovým spôsobom. Medzi nečistoty, ktoré negatívne ovplyvňujú proces výroby hliníka, patrí aj železo. V procese výroby hliníka je prítomné buď vo forme jeho dvoj-, alebo trojmocných iónov, najmä vo forme oxidov (Fe^{II}O, Fe^{III}O₃) alebo fluoridov (Fe^{II}F₂, Fe^{III}F₃). Železo, zlúčeniny železa, negatívne ovplyvňujú proces výroby hliníka. Reagujú so zložkami elektrolytu a tým menia štruktúru elektrolytu a taktiež znižujú prúdovú účinnosť procesu a kontaminujú produkovaný hliník. Z týchto dôvodov bolo potrebné klasifikovať úlohu železa v mechanizme úbytku prúdovej účinnosti, najmä čo sa týka oblasti cyklických redukčno-oxidačných reakcií v elektrolyte.

Po prvý krát sa rozpustnosť oboch oxidov železa v kryolitovej tavenine študovala pomocou vysokoteplotnej NMR techniky. Uskutočnili sa merania rezonančných signálov ²⁷Al, ²³Na a ¹⁹F izotopov v závislosti od množstva skúmaných oxidov, ako aj v závislosti od doby trvania experimentu, pri konštantnej teplote elektrolytu 1020 °C. Pri oboch sústavách sa dokázal vznik oxofluorohlinitanových, Al₂O₆F₆²⁻ resp. Al₂O₂F₄²⁻, komplexov. Pri analýze ¹⁹F izotopu sa zistilo odlišné správanie sa skúmaných oxidov v kryolitovej tavenine. Pri sústave s dvojmocným železom sa ¹⁹F sa dokázal vznik zlúčeniny, obsahujúcej vo svojej štruktúre atómy železa, ktorá odchádza zo systému v parách. Naopak, pri sústave s trojmocným železom vzniká stabilná „Fe“ zlúčenina, ktorá ostáva prítomná v tavenine, pravdepodobne vo forme FeF₆³⁻ iónu.

(NE)PŘÍTOMNOST GLYKOSYLACE U PROTEINŮ SPIROCHET LYMSKÉ BORELIÓZY

**JÁN ŠTĚRBA^a, MARIE VANCOVÁ^{a,b},
NATALIA RUDENKO^{a,b},
MARYNA GOLOVCHENKO^{a,b}, JOHN F. KELLY^c,
C. ROGER MACKENZIE^c, SUSAN M. LOGAN^c
a LIBOR GRUBHOFFER^{a,b}**

^a*Přírodovědecká fakulta JČU v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 37005 České Budějovice;* ^b*Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav, Branišovská 31, 37005, České Budějovice;* ^c*Institute for Biological Sciences, National Research Council of Canada, 100 Sussex Drive, K1A 0R6 Ottawa, Kanada*

Stále větším problémem současnosti jsou takzvané emergentní nákazy (emerging diseases), mezi které patří i klíšťaty přenášená Lymská borelióza. Toto chronické onemocnění, postihující kožní tkáň, klouby, srdce a posléze nervový systém, je způsobeno spirochetami *Borrelia burgdorferi*.

U těchto bakterií byla dosud publikována přítomnost N-glykosylace u třech proteinů: membránových proteinů OspA a OspB¹ a bičíkového proteinu FlaA². Ani v jednom případě nebyla určena struktura těchto glykanů.

Při snaze o zjištění složení glykanů těchto boreliárních proteinů jsme však nebyli schopni prokázat přítomnost glykosylace ani u jednoho z těchto proteinů, izolovaných z borelií kultivovaných ve standardních podmínkách, žádnou z použitých metod (Schiffovo barvení, barvení značenými lektiny, lektinová afinitní chromatografie, enzymatická deglykosylace, hmotnostní spektrometrie). Naproti tomu jsou ve vzorcích izolovaných z borelií přítomny glykoproteiny o větší molekulové hmotnosti. Některé z nich jsou patrně složky kultivačního média.

LITERATURA

1. Sambri V., Stefanelli C., Cevenini R.: Arch. Microbiol. 157, 205 (1992).
2. Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C. A., Charon N. W.: J. Bacteriol. 180, 2418 (1998).

NOVÝ LEKTIN BCLC Z LIDSKÉHO PODMÍNĚNÉHO PATOGENU *Burkholderia cenocepacia*

**ONDŘEJ ŠULÁK^a, MONIA DELIA^a,
NIKOLA KOSTLÁNOVÁ^a, ANNE IMBERTY^b
a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,c}**

^a*Národní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, Brno;* ^b*CERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 09, France;* ^c*Ústav biochemie, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, Brno*

Burkholderia cenocepacia je Gram negativní bakterie, kterou lze nalézt prakticky všude v prostředí a je jedním z patogenů tzv. *Burkholderia cepacia* komplexu (BCC).

Velké problémy způsobuje pacientům trpícím cystickou fibrózou a chronickým granulomatózním onemocněním. Obecně největší komplikací je tzv. *Cepacia syndrom*, rychle postupující plicní onemocnění, vedoucí často k respiračnímu selhání s fatálními následky.

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které mohou aglutinovat buňky a precipitovat glykokonjugáty. Tyto lektiny specificky rozpoznávají cukerné zbytky obsažené na povrchu buněčných stěn a membrán, a tak mění fyziologii ovlivňující aglutinaci, mitózu a další biochemické změny v buňce. Jejich specifita je obvykle definována monosacharidy a oligosacharidy, které jsou tak i nejlepšími přirozenými inhibitory. Zájem o studium lektinů spočívá v jejich široké paletě vlastností a potenciálních aplikací (zemědělství, farmakologie, imunologie, léčba rakovinového bujení atd.).

Hlavním smyslem této studie je snaha porozumět molekulárním mechanismům, zejména protein – sacharidovým interakcím, které umožňují patogenní bakterii takto napadat, kolonizovat a ovlivňovat fyziopatologii jejich hostitele.

V genomu *B. cenocepacia* byly nalezeny čtyři geny kodující proteinové homology lektinu PA-IIL z *Pseudomonas aeruginosa*, který je jedním z virulentních faktorů tohoto patogenu¹. Jeden z nich, lektin BclC, byl klonován a připraven v rekombinantní formě. BclC je 28 kDa protein, který je schopen rozpoznávat D-manosylované sacharidové struktury. Sekvenční analýza dále ukázala na přítomnost dvou oddělených domén ve struktuře proteinu. C-terminální část, kóduje lektinovou doménu, zatímco N-terminální část nemá žádného známého sekvenčního homologa v současných genomových či proteinových databázích. Obě domény byly také klonovány zvlášť, což zjednodušuje další strukturní – funkční charakterizace.

Detailní funkční studie pomocí Surface Plasmon Resonance a mikrokolorimetrických metod umožnily charakterizovat vazebné vlastnosti (afinita, specifita) a termodynamické parametry interakce lektinu s vybranými sacharidy.

Znalost afinity lektinu k různým sacharidům, podpořená zároveň i znalostí struktury proteinu může v budoucnu posloužit jako výchozí bod v designu nových a účinných ligandových analogů a inhibitorů. Takovéto studie mohou napomoci k vytvoření koncepce účinného boje proti těmto patogenním agens.

Tato práce byla podporována Ministerstvem školství (MSM0021622413), Grantovou agenturou ČR (303/06/0570) a francouzskou nadací Vaincre la Mucoviscidose.

LITERATURA

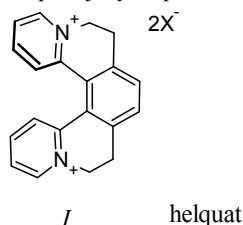
1. Lameignère, E., Malinovská, L., Sláviková, M., Duchaud, E., Mitchell, E.P., Varrot, A., Šedo, O., Imberty, A., Wimmerová, M.: Biochem. J. (2008) Immediate Publication, doi:10.1042/bj20071276

HELQUAT: SNADNÁ PŘÍPRAVA UNIKÁTNÍHO HELIKÁLNÍHO DIKATIONTU

LOUIS ADRIAENSSENS^a, LUKÁŠ SEVERA^a,
TEREZA ŠÁLOVÁ^a, RADEK POHL^a,
DAVID ŠAMAN^a, IVANA ČÍSAŘOVÁ^b,
LUBOMÍR POSPÍŠIL^a, PETR SLAVÍČEK^c
a **FILIP TEPLÝ^{a,*}**

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha, ^bKatedra anorganické chemie, PŘF, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha, ^cÚstav fyzikální chemie, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
teply@uochb.cas.cz

N-Heteroaromatické kationty jsou látky se širokým aplikačním potenciálem. Katalyzátory fázového přenosu, iontové kapaliny, molekulární zařízení, látky pro nelineární optiku, barviva, DNA interkalátory a řada biologicky účinných struktur pochází z této skupiny¹. Helikálně chirální *N*-heterohelicena² patří v tomto směru k obzvláště atraktivním a dosud opomíjeným species³.



Vyvinuli jsme krátkou syntézu helikálního extendovaného diquat (helquat), který je reprezentativním příkladem skupiny vodorozpustných neplanárních organických dikationtů. Třístupňová syntéza čistého vzorku látky **I** lze snadno provést bez potřeby chromatografické separace. Syntéza využívá [2+2] cykloisomerizační strategie⁴, která se ukazuje jako vhodná metoda pro přípravu této slibné skupiny látek. Studovali jsme chování při dvouelektronové redukci látky **I** a také kinetiku inverze helixu. Příprava a využití dalších látek z této rodiny je předmětem výzkumu.

Podporováno ÚOCHB AV ČR (výzkumný záměr Z4 055 0506).

LITERATURA

- Parenty A. D. C., Smith L. V., Guthrie K. M., Long D. L., Plumb J., Brown R., Cronin L.: *J. Med. Chem.* **48**, 4504 (2005) a citace tam uvedené.
- Sato K., Arai S., v knize: *Cyclophane Chemistry for the 21st Century*, str. 186. (Takemura H., ed.), Research Signpost, Trivandrum 2002.
- Herse C., Bas D., Krebs F. C., Bürgi T., Weber J., Wesolowski T., Laursen B. W., Lacour J.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **42**, 3162 (2003).
- Stará I. G., Starý I., Kollárová A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: *J. Org. Chem.* **63**, 4046 (1998).

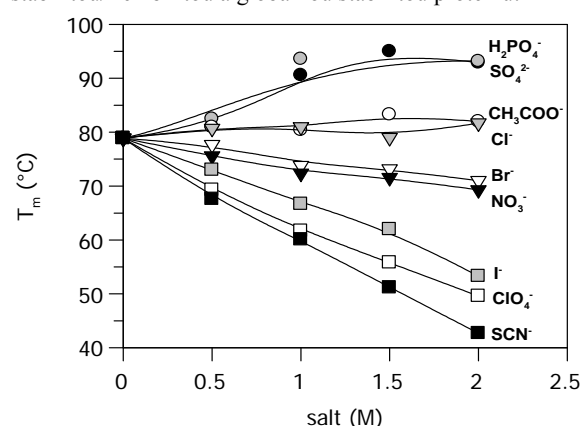
MODULÁCIA LOKÁLNEJ A GLOBÁLNEJ DYNAMIKY FERRICYTOCHRÓMU *c*

N. TOMÁŠKOVÁ, R. VARHAČ a E. SEDLÁK

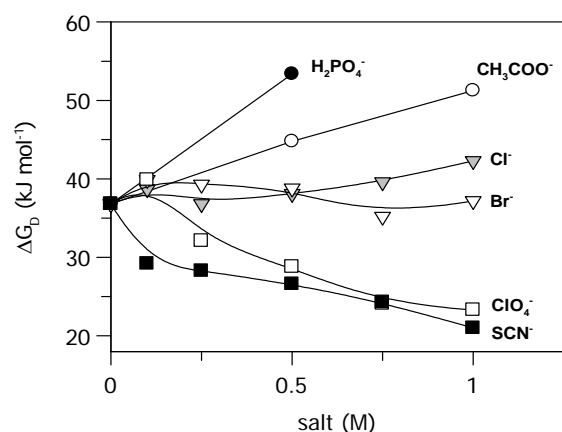
Katedra biochemie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice, Slovensko

Dynamika proteínov ovplyvňuje ako globálne (napr. termodynamickú stabilitu) tak aj lokálne (napr. aktivitu) vlastnosti proteínov. Preto je dôležité nájsť vzťah medzi dynamikou a termodynamickými vlastnosťami proteínov. V tejto práci sme sledovali lokálnu dynamiku ferricytochrómu *c* prostredníctvom rýchlosti viazania kyanidu na hémové železo. Zmenu jeho globálnej dynamiky sme monitorovali prostredníctvom zmeny termodynamickej stability v dôsledku teplotnej a izotermálnej denaturácie. Ako modulátory dynamiky proteínu boli použité ióny Hofmeisterovej série.

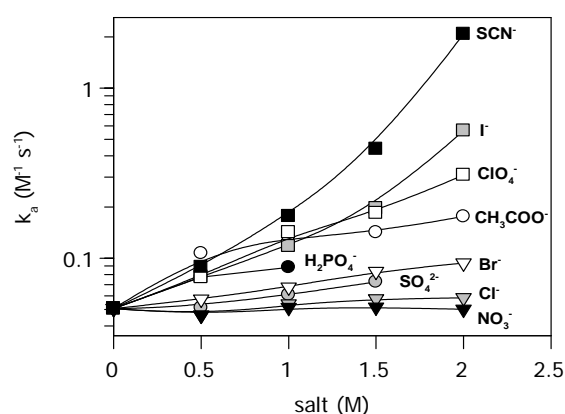
Ukázali sme, že zmena celkovej konformačnej dynamiky proteínu má výrazný vplyv na kinetické a termodynamické parametre reprezentované rýchlostnou konštantou asociácie (k_a) viazania kyanidu, teplotou topenia (T_m) a Gibbsovou voľnou energiou (ΔG_D) izotermálnej denaturácie. Z našich výsledkov vyplýva, že kozmotropné ióny zvyšujú T_m a chaotropné ióny naopak prispievajú k znižovaniu T_m ferricytochrómu *c* (Obrázok 1). Podobným spôsobom sa prejavil účinok iónov aj na hodnoty ΔG_D , kedy sa táto hodnota menila z 36,8 kJ mol⁻¹ (bez soli) na 53,4 kJ mol⁻¹ (0,5 M NaH₂PO₄, Obrázok 2). V prípade silného chaotropného iónu SCN⁻, sa ΔG_D zredukovalo na 21,0 kJ mol⁻¹ (1,0 M KSCN). Hodnoty k_a sa pohybovali od 0,051 M⁻¹ s⁻¹ (bez soli) do 2,08 M⁻¹ s⁻¹ (2,0 M KSCN, Obr. 3) a korelovali so schopnosťou použitých iónov destabilizovať štruktúru proteínu. Za zmienku stojí, že prítomnosť iónov nijako neovplyvňovala natívnu konformáciu ferricytochrómu *c* pri laboratórnej teplote a pH 6,0. Naše výsledky poukázali na skutočnosť, že anióny Hofmeisterovej série efektívne modifikujú dynamické vlastnosti ferricytochrómu *c* ako aj na to, že existuje blízky vzťah medzi lokálnou stabilitou/flexibilitou a globálnou stabilitou proteínu.



Obr. 1 Závislosť T_m denaturácie ferricytochrómu *c* v prítomnosti rôznych iónov Hofmeisterovej série pozorované pri 396 nm v 50 mM kakodyláte sodnom, pH 6,0



Obr. 2 Závislosť ΔG_D ferricytochrómu *c* v prítomnosti rôznych iónov Hofmeisterovej série pozorované v 5 mM kakodyláte sodnom, pH 6,0, 24 °C



Obr. 3 Závislosť k_a viazania kyanidu do ferricytochrómu *c* v prítomnosti rôznych iónov Hofmeisterovej série pozorované pri 418 nm v 50 mM kakodyláte sodnom, pH 6,0, 24 °C

EKDYSTEROIDY ZVYŠUJÚ VÝTĚŽEK FOTOSYNTETICKÉ FIXACE CO₂

ONDŘEJ UHLÍK^{a,b}, MAREK KAMLAR^{a,b},
LADISLAV KOHOUT^a, JURAJ HARMATHA^a
a TOMÁŠ MACEK^a

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bVŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6
ondrej.uhlik@seznam.cz

Ekdysteroidy jsou nízkomolekulární látky steroidní povahy, jejichž funkcí je regulace celé řady fyziologických procesů u hmyzu, např. svlékání, syntéza kutikuly nebo embryonální vývoj. Nedostatek nebo přebytek těchto látek v těle hmyzu může mít fatální následky. Ekdysteroidy jsou ale hojně syntetizovány i v rostlinách. Jejich funkce ani mechanismus působení v těchto organismech však dosud nebyl dostatečně prozkoumán. Cílem této studie bylo

izolovat vazebné bílkoviny ekdysteroidů a přispět tak k objasnění funkce těchto látek v rostlinách.

Výchozím materiálem pro izolaci vazebných bílkovin byl špenát, který obsahuje velké množství ekdysteroidů, především pak 20-hydroxyekdysonu. Tento steroid byl navázán na nosič a vazebné bílkoviny byly z rostlinného materiálu izolovány pomocí afinitní chromatografie. Specificky navázané proteiny byly eluovány změnou pH, elektroforeticky rozděleny a následně identifikovány. Touto metodou se podařilo izolovat dva proteiny odpovídající malé a velké podjednotce enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (RuBisCO), nejrozšířenějšího enzymu biosféry, který je zodpovědný za zabudování oxidu uhličitého do organické hmoty. Na rychlosti této reakce závisí výtěžek celé fotosyntézy. Protože enzym RuBisCO vykazoval afinitu k 20-hydroxyekdysonu, byl dále testován vliv tohoto steroidu na karboxylasovou aktivitu volného enzymu. Tyto testy ukázaly, že je-li 20-hydroxyekdyson vůči enzymu v desetinásobném přebytku, dojde ke zvýšení výtěžku fixace CO₂ katalyzované enzymem RuBisCO o 13 %. Další přírodní ekdysteroidy ajugasteron C, polypodin B nebo směsné ekdysteroidní frakce izolované z kořenů leuzezy saflorové (*Leuzea carthamoides*) vykazovaly obdobný účinek jako 20-hydroxyekdyson – pokud byly přidány do reakční směsi, byl výtěžek reakce vyšší o 10–13 %.

Tato studie představuje první případ, kdy byl popsán regulační účinek ekdysteroidů v rostlinách. Zároveň tyto výsledky reprezentují objev nové skupiny regulačních molekul enzymu RuBisCO, jejichž použití by mohlo mít v budoucnu velké využití.

Tato práce byla podporována projekty Z40550506, MSM6046137305 a IM06030.

KMENE ZELENÉJ RIASY *Scenedesmus quadricauda* REZISTENTNÉ K SELÉNU

D. UMYSOVÁ, M. HLAVOVÁ, I. DOUŠKOVÁ,
M. VÍTOVÁ a V. ZACHLEDER

Mikrobiologický ústav AV ČR, 379 81 Třeboň

Selén je esenciální prvek potřebný v diete mnohých organizmů, vrátane človeka. Medzi jeho nedostatkom a toxicitou je len veľmi malá hranica. Toxicita selénu je spôsobená vznikom reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré poškadzujú DNA. V malých dávkach však selén pôsobí antioxidantne, protirakovinovo, imunostimulačne a chemopreventívne. Štúdie ukazujú, že sa podieľa na detoxikácii ťažkých kovov a organických karcinogénov v organizme a je vo forme peroxidáz jednou z najaktívnejších zložiek antioxidantnej a antiradikálovej ochrany organizmu.

Scenedesmus quadricauda je chlorokokálna jednobunková riasa deliaca sa formou cenóbií. Jej dlhodobým kultivovaním v médiu s vysokou koncentráciou selénu sa nám podarilo vyselektovať kmene odolné voči rôznym formám a koncentráciám selénu. Patentovali sme tri kmene odolné voči vysokým koncentráciám selénu a to buď vo forme selenanu, seleničitanu alebo súčasne obom formám selénu v médiu. Tieto kmene môžu byť vhodným zdrojom

organicky viazaného selénu pre výrobu selénom obohatenej biomasy.

Tento projekt bol podporený grantom GA AV číslo A600200701, projektom EUREKA číslo OE221 a výskumným zámerom číslo AV0Z5020903.

CHITOSAN JAKO PRODRUG FORMA ISONIAZIDU

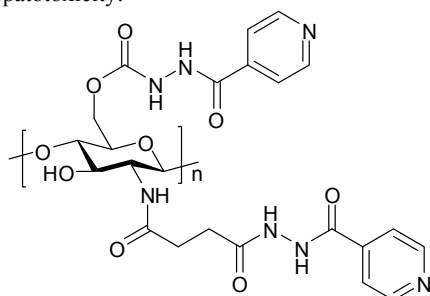
EVA VAVŘÍKOVÁ a JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové

Polymerní sloučeniny jsou v dnešní době stále častěji využívány jako vhodné biodegradabilní nosiče léčiv. Používají se k pomalému uvolňování účinné složky tedy jako depotní formy, ke zvyšování rozpustnosti a lepší možnosti cíleného podání.

Chitosan patří mezi méně časté polykationtové polysacharidy vyznačující se výjimečnými vlastnostmi, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní¹. Samotný vykazuje antibakteriální a protinádorovou aktivitu, v poslední době byla publikována též jeho antioxidační aktivita². Tyto jeho vlastnosti z něho činí velmi zajímavý bioaktivní materiál pro farmaceutické a biomedicínské odvětví. Lze jej použít jako systém pro transport léčiv, jehož hlavním aspektem je kontrolované uvolňování, cílení léčiva a prodloužení doby působení.

Naše práce se zabývá spojením chitosanu a antituberkulotika první volby isoniazidu, tedy vytvořením prodrug formy, která by byla dobře rozpustná ve vodě a méně hepatotoxická než samotný isoniazid. Pro spojení hydroxylové nebo aminové skupiny s isoniazidem byl vybrán *O*-karboxymetylový³ nebo *N*-sukcinylanhydridový⁴ můstek. K aktivaci byl použit *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid. V prezentaci budou uvedeny hlavní charakteristiky produktů, vyhodnocení biologické aktivity a popř. hepatotoxicity.



Tato práce vznikla za podpory MSM 0021620822 a GAUK 76807/2007.

LITERATURA

1. Uraganu T., Tokata S. (ed.): *Material Science of Chitin and Chitosan*, Springer, New York 2006.
2. Vavříková E., Vinšová J.: Chem. Listy (2008), posláno do tisku.

3. Fan L., Du Y., Zhang B., Yang J., Zhou J., Kennedy J. F.: Carbohydr. Polym. 65, 447 (2006).
4. Yan Ch., Chen D., Gu J., Hu H., Zhao X., Qiao M: The Pharmaceutical Society of Japan 126, 789 (2006).

CHARAKTERIZÁCIA VLASTNOSTÍ MITOCHONDRIÁLNÉHO HMG-BOX OBSAHUJÚCEHO PROTEÍNU *CamtHMG1 Candida albicans*

**KATARÍNA VIŠACKÁ^a, JOZEF NOSEK^b
a EUBOMÍR TOMÁŠKA^a**

^aKatedra genetiky a ^bKatedra biochémie, Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Mlynská dolina ^aB-1 a ^bCH-1, 842 15 Bratislava
visacka@fns.uniba.sk

Molekuly mitochondriálnej DNA (mtDNA) sú zbalované do komplexov nazvaných mitochondriálne nukleoidy. Tieto štruktúry sú vyžadované v stabilizácii, udržiavaní a dedičnosti mitochondriálnych genómov. Študovanie ich štruktúry a dynamiky môže prispieť k odhaleniu molekulárnych princípov, ktoré regulujú mitochondriálnu dedičnosť. Hlavným proteínovým komponentom mt-nukleoidov *Saccharomyces cerevisiae* je Abf2p obsahujúci dve *HMG-box* domény umožňujúce viazanie a zbalenie mtDNA¹. Analýzou genómovej sekvencie kvasinky *Candida albicans* bola zistená prítomnosť otvoreného čítacieho rámca kódujúceho potenciálny mitochondriálny proteín *CamtHMG1* obsahujúci minimálne jednu *HMG-box* doménu a N-koncovú presekvenciu². *CamtHMG1* môže reprezentovať alternatívny typ zbalovacieho proteínu, ktorého molekulárno-biologické vlastnosti sme skúmali.

LITERATÚRA

1. Diffley J. F., Stillman B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7864 (1991).
2. Nosek J., Tomáška L., Boloti-Fukuhara M., Miyakawa I.: FEMS Yeast Res. 6, 356 (2006).

CHARAKTERIZACE VOSKOVÝCH ESTERŮ POMOCÍ MALDI-TOF HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**VLADIMÍR VRKOSLAV, MILOSLAV ŠANDA
a JOSEF CVAČKA**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Skupina hmotnostní spektrometrie, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
vrkoslav@uochb.cas.cz

Voskové estery, estery vyšších mastných kyselín a vyšších alkoholů, jsou produkovány téměř všemi rostlinami i živočichy ve směsích s dalšími látkami s nízkou polaritou¹. Tyto směsi (vosky) plní různé funkce. Vosky tvoří ochrannou vrstvu povrchu těla rostlin a hmyzu. Některé

drůhy hmyzu (včely, čmeláci) vytvářejí pomocí speciálních žláz vosk, který využívají pro skladování potravy nebo vývoj larev. Jsou obsaženy také v sekretech, kterými si ptáci mastí peří a savci srst, hlubokomořské organismy je využívají jako zásobárnu energie namísto triacylglyceridů. U člověka hrají důležitou úlohu při ochraně pokožky a slzného filmu oka. Voskové estery našli uplatnění ve farmaceutickém, kosmetickém, potravinářském a elektrotechnickém průmyslu. Základním předpokladem úspěšného výzkumu a využití voskových esterů je dostupnost spolehlivých metod pro jejich analýzu. Nejvyužívanější metodou analýzy je plynová chromatografie. Tato technika je vhodná pro analýzu těkavějších voskových esterů. Zastoupení méně těkavých voskových esterů v přírodních směsích však tímto způsobem odhalit nelze. Hlavním cílem tohoto projektu je najít vhodnou matici a vyvinout metodu pro charakterizaci přírodních směsí voskových esterů za využití MALDI-TOF, která umožní charakterizovat voskové estery i vyšších molárních hmotností.

Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) a její alkalické soli (${}^6\text{LiDHB}$, LiDHB , NaDHB , KDHB , RbDHB a CsDHB) byly studovány jako potenciální matrice pro ionizaci voskových esterů. Tyto soli byly připraveny neutralizací DHB příslušnými uhličitany. Standardy voskových esterů poskytovali s maticemi LiDHB , NaDHB a KDHB molekulové adukty $[\text{M}+\text{Li}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a $[\text{M}+\text{K}]^+$. Energie potřebná k jejich tvorbě se vzrůstajícím protonovým číslem alkalického kovu rostla. Odpovídající molekulové adukty voskových esterů při použití matic RbDHB a CsDHB pozorovány nebyly. SDHB se tvořily také molekulové adukty $[\text{M}+\text{Na}]^+$, očekávané adukty $[\text{M}+\text{H}]^+$ nebyly pozorovány. Přírodní lithium obsahuje 5 % ${}^6\text{Li}$ a 95 % ${}^7\text{Li}$. LiDHB připravené z tohoto uhličitany poskytuje složitější isotopový klastr, což znesnadňuje interpretaci MALDI spektra komplexních přírodních směsí voskových esterů. ${}^6\text{LiDHB}$ se ukázala být nejvhodnější ze studovaných matic pro jednoduchost isotopového klastru a nejvyšší intenzitu signálu poskytovanou při nízké intenzitě energie laseru. Pro ${}^6\text{LiDHB}$ byl optimalizován způsob nanášení matrice a vzorku na terčovou desku. Jako nejvhodnější se ukázala metoda dvou vrstev, kdy byl na povrchu terčové desky z vytvořen povlak z 0,8 μl roztoku matrice (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a na něj byl dávkován stejný objem roztoku vzorku. Byl zjištěn optimální molární poměr vzorku:matrice – 1:100. Za těchto podmínek bylo dosaženo detekčního limitu v oblasti stovek fmol. Za použití techniky fragmentace za zdrojem (PSD) byla měřena fragmentační spektra voskových esterů. Majoritní pik ve spektru odpovídá litnému aduktu kyseliny, která voskový ester tvoří. Vyvinutá metoda byla otestována na řadě přírodních směsí voskových esterů.

Tato práce byla financována z prostředků AV ČR - startovací projekt č. AV0Z40550506-I058.

LITERATURA

- Hamilton R. J. (ed.): *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press Ltd., Dundee 1995.

BIODEGRADACE PBDE POMOCÍ KONSORCIÍ MIKROORGANISMŮ Z KALŮ ČOV, IDENTIFIKACE PRODUKTŮ A MONITORING EKOTOXICITY

JANA ZLÁMALÍKOVÁ^a, KATEŘINA DEMNEROVÁ^a, MARTINA MACKOVÁ^a, JANA HAJŠLOVÁ^b, JANA PULKRABOVÁ^b a HANA STIBOROVÁ^a

*^aÚstav biochemie a mikrobiologie, ^bÚstav chemie a analýzy potravin, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
zlamalij@vscht.cz*

Polybromované difenylethery (PBDE) se řadí mezi bromované retardátory hoření (BFR). PBDE jsou značně lipofilní a perzistentní látky, které mohou být bioakumulovány v tukových tkáních živých organismů¹. Jsou strukturně podobné polychlorovaným bifenylym (PCB) a dichlordifenyltrichlormethanu (DDT), proto mají podobné chemické vlastnosti². Velké riziko vzniká při jejich spalování, protože mohou vznikat velmi toxické sloučeniny jako polybromované dibenzofurany (PBDF) a polybromované dibenzodioxiny (PBDD)³. Ačkoli je jejich akutní toxicita nízká, působí níže bromované kongenery jako endokrinní disruptory, karcinogeny a neurotoxické látky. Také dekabromdifenylether (BDE 209) je klasifikován jako možný lidský karcinogen a existují zprávy o jeho debrominaci na níže bromované kongenery⁴. Proto jsme se rozhodli studovat bioremediaci těchto látek.

V projektu se zabýváme biodegradací PBDE ve vzorcích kalů čistíren odpadních vod (ČOV) jak za aerobních, tak za anaerobních podmínek. Kromě analýzy obsahu PBDE jsou identifikovány meziproducty degradace a změna ekotoxicity. Množství PBDE je měřeno plynovou chromatografií (GC/MS-NCI). Ekotoxicita je sledována pomocí tří testů: testu inhibice růstu kořene salátu hlávkového ve vodném výluhu; testu inhibice růstu kořene salátu hlávkového kontaktním testem; stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi bakterie *Vibrio fischeri*. K identifikaci vzniklých meziproductů degradace využíváme databáze relativních retenčních časů ($\text{RRT}_{\text{database}}$) vypočtených pro 126 BDE kongenerů⁵.

Po provedeném monitoringu kontaminace a ekotoxicity 15 kalů a 13 sedimentů byly pro degradační pokusy vybrány kal ČOV Hradec Králové a kal ČOV Modřice. Po 3 měsících kultivace byl zaznamenán úbytek PBDE u kultivace za aerobních podmínek až o 30 %. Nově vzniklé meziproducty byly identifikovány jako 4,4'-dibromdifenylether a tribromovaný kongener (koeluce BDE 34, 26, 29 a 32). V průběhu degradačního pokusu byla současně sledována ekotoxicita vzorků.

Autoři děkují Ing. Monice Stavělové za pomoc při získání vzorků kontaminovaných kalů a sedimentů a za finanční podporu projektů MŠMT NPVII 2B06151, GA ČR 104/08/P188 a MSM 6046137305.

LITERATURA

- <http://www.env.cz/zpp05/c2.htm> (staženo 14. 1. 2008).

- Rahman F., Langford K. H., Scrimshaw M. D., Lester J. N.: *Sci. Total Environ.* 275, 1 (2001).
- Pouстка J., Hajšlová J., Kazda R.: *Závěrečná zpráva. VŠCHT v Praze, Praha 2004.*
- He J., Robrock K. R., Alvarez-Cohen L.: *Environ. Sci. Technol.* 40, 4429 (2006).
- Korytář P., Covaci A., de Boer J., Gelbin A., Brinkman U. A. Th.: *J. Chromatogr., A* 1065, 239 (2005).

**VÝZKUM BIOSYNTÉZY SLOŽEK SAMČÍCH
ZNAČKOVACÍCH FEROMONŮ ČMELÁKŮ DRUHŮ
BOMBUS LUCORUM A *BOMBUS LAPIDARIUS***

**PETR ŽÁČEK^{a,b}, ANNA LUXOVÁ^a, JIŘÍ KINDL^a
a IRENA VALTEROVÁ^a**

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra analytické chemie, PŘF UK, Albertov 8, 128 40 Praha 2
zacek@uochb.cas.cz

Tato práce se zabývá studiem biosyntézy složek samčího značkovacího feromonu čmeláků druhů *Bombus lucorum* a *Bombus lapidarius*. Strategie výzkumu byla založena na aplikaci deuterovaných mastných kyselin o různé délce uhlíkového řetězce do abdomenu. Oblast aplikace byla zvolena na základě předpokladu, že jako prekurzory feromonů používají čmeláci mastné kyseliny^{1,2} uskladněné ve formě acylglycerolů v tukovém tělese v abdomenu. Značkovací feromon je produkován a uskladňován v cefalické části labiální žlázy³. Po 2–4-denní inkubaci značených mastných kyselin byly extrakty labiálních žláz a tukových těles obou druhů analyzovány technikou dvourozměrné plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Analýzy extraktů těchto orgánů potvrdily přítomnost deuterovaných metabolitů vzniklých z aplikovaných značených kyselin. Byly nalezeny sloučeniny, které dokazují, že enzymatický systém čmeláka byl schopen použít aplikované deuterované látky na syntézu některých složek feromonu. Sloučeniny vzniklé z aplikovaných látek: mono, di a triacylglyceroly, ethylestery, alkoholy, uhlovodíky a rovněž jejich homology vzniklé prodloužením deuterovaného uhlíkového řetězce příslušné aplikované kyseliny. U všech typů nalezených metabolitů byly rovněž objeveny sloučeniny s nasyceným i nenasyceným uhlíkovým řetězcem. Vzniklé sloučeniny ukazují na přítomnost enzymů ve zkoumaných částech čmeláčího těla obou druhů – ethylesteras, desaturas, elongas, reduktas a dekarboxylas.

Analýzy zároveň poskytly data o chování deuterovaných a částečně deuterovaných sloučenin ve dvoudimenzionálním separačním systému a o jejich hmotnostních spektrech.

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (číslo projektu: 2B06007) a Grantové agentury Akademie věd České republiky (čísla projektů: A4055403 a Z40550506).

LITERATURA

- Lanne B. S., Bergström G., Wassgren A.-B., Törnback B.: *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 631 (1987).
- Luxová A., Valterová I., Stránský K., Hovorka O., Svatoš A.: *Chemecol* 13, 81 (2003).
- Bergström G., Svensson B. G., Appelgren M., Groth I.: Academic Press, London and New York Vol. 19, p. 175 (1981).



SIGMA-ALDRICH

REJSTRÍK AUTORŮ

Adameová, Adriana	374	Holý, Petr	368
Adriaenssens, Louis	398	Honzatko, Ales	368
Altmannová, Veronika	384	Horáčková, Jana	375
Andronova, Angelina	367	Hošek, Jan	380
Babák, Vladimír	391	Houser, Josef	376
Babčanová, Soňa	377	Hroudová, Miluše	376
Babušíková, Eva	367, 375	Hrstka, Roman	377
Bártek, J.	386	Hublarová, Pavla	377
Bartoš, Milan	380, 389	Chaloupková, R.	387
Bartošová, Ladislava	380	Chocholoušová, Jana	378
Bělohradský, Martin	368, 369	Chrastilová, Zuzana	370, 378
Bessada, Catherine	396	Imberty, Anne	397
Bezouška, Karel	391	Ivančáková, R.	393
Bláha, Luděk	387	Janiczek, Oldřich	376
Blanářová, Olga	367	Jendželovský, Rastislav	379
Blokešová, Darja	384	Jiroutová, A.	392
Boča, Miroslav	396	Jonsztová, Beata	386
Bojarová, Pavla	391	Jun, Daniel	389
Brichac, Jiri	368	Jurček, Ondřej	395
Buděšinský, Miloš	370	Jurečková, Jana	375
Budka, Jan	382	Kaftan, Filip	379
Buchta, Michal	368	Kaminský, Jakub	396
Burketová, Lenka	381	Kamlar, Marek	399
Bystrický, Slavomír	372	Kanta, J.	392
Cišarová, Ivana	382, 398	Kello, Martin	379
Clemence, Nathan	367	Kelly, John F.	397
Cvačka, Josef	379, 400	Kindl, Jiří	402
Čada, Zdeněk	395	Kirschnerová, Renáta	367
Čejka, Jiří	369	Kiššová, I.	371
Damborský, J.	387	Klán, Petr	387
Daněk, Vladimír	396	Kliment, Ján	390
Dekoj, Václav	369	Kliment, Ján ml.	390
Delia, Monia	397	Klvaňa, M.	387
Demel, Jan	369	Kohout, Ladislav	398
Demnerová, Kateřina	401	Kohout, Michal	380
Dobrota, Dušan	367, 390	Kolarov, J.	371
Doležal, Karel	373	Kolář, Michal	395
Doležilková, Ivana	370	Kolorz, Michal	380
Doubek, Michael	394	Kopecný, Jan	390
Doušková, I.	399	Korbelová, Barbora	381
Dračínský, Martin	370	Kostlánová, Nikola	397
Drašar, Pavel	386, 395, 396	Kotik, Michael	368
Drobcová, B.	371	Kotora, Martin	370
Dvořák, P.	387	Kotrba, Pavel	385
Dvořáková, Hana	382	Kotrbová, V.	381
Eigner, Václav	382	Kovaľ, Ján	379
Eignerová, Barbara	371	Kozubík, A.	367, 384, 393
Farkaš, Pavol	372	Köhlerová, R.	392
Fedoročko, Peter	373, 379	Král, Vladimír	378
Fodor, József	381	Kramara, J.	374
Frei, E.	381	Krejčí, Lumír	384
Galiová, Gabriela	372	Krejčík, Zdeněk	376
Gažák, Radek	391	Křen, Vladimír	391
Gemrotová, Markéta	373	Křenek, Karel	391
Glogarová, Milada	380	Křenek, Peter	374
Golovchenko, Maryna	375, 397	Kuča, Kamil	389
Grada Kuliková, Lucia	373	Kuglík, Petr	394
Grubhoffer, Libor	375, 390, 397	Kundrát, Ondřej	382
Grznárová, P.	374	Kuznetsov, Yurii	372
Gunišová, S.	374	Kuželová, Magdaléna	374
Hajšlová, Jana	401	Lacina, Lukáš	395
Hajzlerová, M.	392	Lamač, Martin	382
Hampl, A.	384	Langrová, Tereza	383, 391
Harčárová, Anna	374	Lhoták, Pavel	382
Harmatha, Juraj	399	Lincová, E.	384, 393
Hatok, Jozef	367, 375, 390	Lipnická, Šárka	368, 369
Henke, Adam	380	Lipov, J.	374
Hlavová, M.	399	Logan, Susan M.	397
Hodek, Petr	388	Ludwig, Jost	378
Hofmanová, J.	367	Luxová, Anna	402
Holčáková, Jitka	377	Macek, Tomáš	370, 385, 399

Mackenzie, C. Roger	397	Starý, Ivo	367, 369, 378
Macková, Martina	370, 378, 385, 391, 401	Stibor, Ivan	382
Maixnerová, Jana	384	Stiborová, Hana	401
Maletínská, Lenka	384	Stiborová, M.	381
Marini, Victoria	384	Strnad, Hynek	376, 395
Matáková, Tatiana	375, 390	Strnad, Miroslav	373, 385
Matulová, Petra	384	Suchánek, J.	393
Mayer, Jiří	394	Svoboda, Jiří	380
McPherson, Alexander	372	Svobodová, Hana	395
Mentel, M.	371	Šáchová, Jana	395
Mikeš, Jaromír	379	Šálová, Tereza	398
Mistrík, M.	386	Šaman, David	398
Míšek, Jiří	378	Šanda, Miloslav	379, 400
Mokrý, J.	393	Šebesta, Marek	392
Moserová, M.	381	Šebo, Peter	394
Nagata, Y.	387	Šimák, Ondřej	396
Najmanová, Jitka	385	Šimko, František	396
Nalivaeva, Natalia	367	Šimšová, Marcela	394
Nenuil, Rudolf	377	Šmerdová, Tamara	377
Nisler, Jaroslav	385	Šťastná, Hana	390
Nosek, Jozef	392, 400	Štěpnička, Petr	369, 382
Novák, Petr	388	Štěrbá, Ján	397
Nováková, Zdena	386	Šulák, Ondřej	397
Novotná, Vladimíra	380	Šulc, Miroslav	388
Obšil, Tomáš	388	Teply, Filip	398
Opluštilová, L.	386	Tibor, Füzik	372
Pačes, Jan	395	Tichý, Boris	394
Pačes, Václav	376, 395	Tomáška, E.	374
Palumbo, Giuseppe	373	Tomáška, Lubomír	392, 400
Park, Sang-Eon	369	Tomášková, N.	398
Pavliková, Nela	387	Turner, Anthony	367
Pavlová, M.	387	Uhlík, Ondřej	399
Pernicová, Z.	384, 393	Ulbrich, Pavel	372
Petrovič, Pavol	388	Umysová, D.	399
Pešlová, Kateřina	388	Vacek, Jaroslav	378
Picklo, Matthew J.	368	Vaculová, A.	367
Pohanka, Miroslav	389	Valent, Ivan	388, 392
Pohl, Radek	398	Valentová, Olga	381
Pojarová, Michaela	382	Valterová, Irena	402
Polčic, P.	371	Vancová, Marie	390, 397
Pospíšil, Lubomír	398	Vančo, Ján	389
Pospíšilová, Šárka	394	Varhač, R.	398
Pražáková, Veronika	389	Vavříková, Eva	400
Pulkrabová, Jana	401	Velebný, V.	392
Račay, Peter	375	Vinšová, Jarmila	400
Rakhmatoulline, Aidar	396	Višacká, Katarína	400
Rídl, Jakub	376	Víšek, B.	393
Rudenko, Nataliia	375, 397	Vítová, M.	399
Ruml, Tomáš	372, 374	Vlček, Čestmír	376, 395
Růžek, Daniel	390	Vojta, Petr	376
Rybáček, Jiří	368	Vojtěšek, Bořivoj	377
Ryšánek, Dušan	383, 391	Vrkošlav, Vladimír	400
Sedlák, E.	398	Wade, R.C.	387
Severa, Lukáš	398	Williams, Spencer J.	391
Sivoňová, Monika	375, 390	Wimmer, Zdeněk	395
Skládal, Petr	389	Wimmerová, Michaela	376, 397
Sládek, Zbyšek	383, 391	Zahradník, Ivan	388
Sláma, Petr	383, 391	Zahradníková, Alexandra	388
Slámová, Kristýna	391	Zachleder, V.	399
Slaviček, Petr	398	Zatloukal, Marek	373
Slavkovský, R.	392	Zima, Jiří	368
Smetana, Karel	395	Zlámáliková, Jana	401
Smreková, Eva	392	Zouharová, Monika	383, 391
Sobotka, L.	392	Žáček, Petr	402
Souček, K.	367, 384, 393	Železná, Blanka	384
Soukup, T.	393		
Sova, P.	367		
Spíchal, Lukáš	373, 385		
Staněk, Ondřej	394		
Staňo Kozubík, Kateřina	394		
Stará, Irena G.	367, 378		
Staršichová, A.	384, 393		

