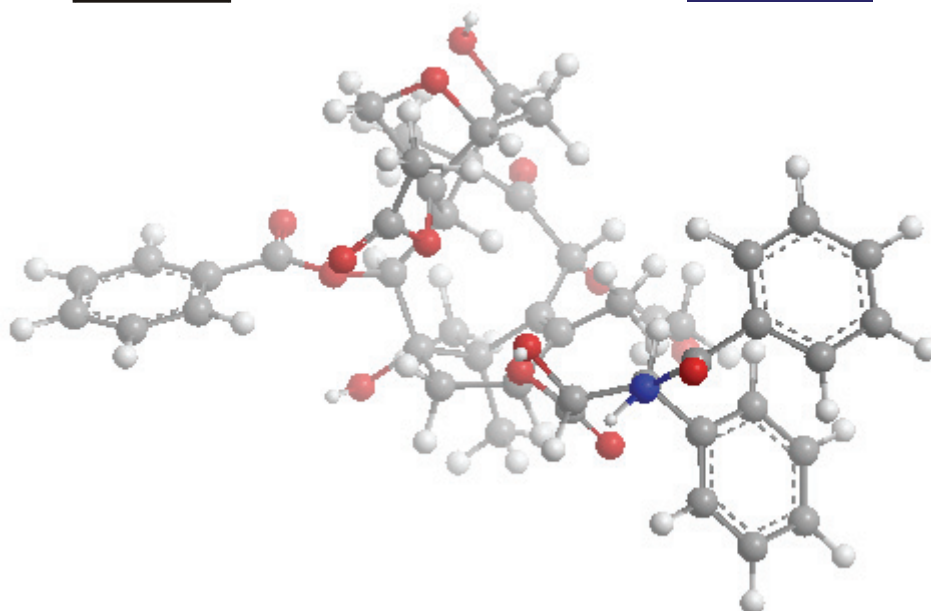




**SIGMA-ALDRICH**



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

12.6. – 15.6. 2006

Devět skal - Žďárské vrchy

sborník redigovali  
Radmila Řápková, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

### *VII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků*

Tzv. „Konference mladých“ oslaví letos již 7.výročí. Byla jsem požádána o napsání úvodního slova ke sborníku prací tohoto ročníku. Myslím, že již není třeba velkého opěvování akce, která se za těch 7 let dostala do povědomí české vědecké společnosti a získala si značnou prestiž. U jejího zrodu stál můj (dnes již bývalý) kolega Martin Fusek. Chtěla bych mu tímto poděkovat za nápad, který tato setkání odstartoval a slíbit, že společně s ostatními nadšenci, bez nichž by uskutečnění všech ročníků bylo nemyslitelné (mám na mysli především odbornou komisi, která vybírá účastníky i vítěze), budu v této tradici pokračovat.

Zároveň bych ráda zmínila, že firma Sigma-Aldrich obnovila po mnoha letech své působení na Slovensku a proto bych si přála, aby se dalšího ročníku konference zúčastnili též mladí vědečtí nadšenci ze Slovenska. Jistě by to přineslo další zpestření, ještě větší konkurenci i možnost navázat nové kontakty.

Sedmému ročníku konference přeji hodně zdaru, všem účastníkům hodně úspěchů a pěkných zážitků a odborné komisi opětovně zvládnutí nelehkého úkolu vybrat vítěze.

Daniela Dornerová  
Sigma-Aldrich Praha

## STRUKTURNĚ FUNKČNÍ STUDIE AFINITNÍCH ZMĚN V LEKTIN-SACHARIDOVÝCH SYSTÉMECH; POČÍTAČOVÁ CHEMIE VE SLUŽBÁCH PROTEINOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

JAN ADAM<sup>a</sup>, MARTINA POKORNÁ<sup>a</sup>, CHARLES SABIN<sup>b</sup>, ZDENĚK KRÍŽ<sup>a</sup>, ANNE IMBERTY<sup>b</sup>, JAROSLAV KOČA<sup>a</sup> a MICHAELA WIMMEROVÁ<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Národní centrum pro výzkum biomolekul a <sup>c</sup>Katedra biochemie, PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; <sup>b</sup>CERMAV-CNRS, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble, Francie

Současné výpočetní kapacity a metody dovolují provádět sofistikované simulace a modelování složitých, avšak z hlediska života organismů fundamentálních procesů, jakými jsou biomolekulární interakce. Tyto postupy v sobě skrývají vysoký potenciál z hlediska úspory experimentálního času a prostředků.

Lektiny jsou skupinou bílkovin vyznačující se schopností vázat sacharidové struktury s vysokou afinitou a specificitou. Sacharidy se vyznačují vysokou variabilitou konformačních možností, ať už z hlediska izomerie nebo intermolekulárních struktur, což z nich činí důležité agens v procesu rozpoznávání, zprostředkovaného právě lektiny. Propojení praktických metod molekulární biologie a strukturních a funkčních analýz (X-ray krystalografie, termodynamické metody) je klíčové pro porozumění vzájemným souvislostem mezi strukturou a vlastnostmi proteinů. Čím úplnější je toto porozumění, tím účinněji je možno posléze designovat proteiny s definovanými požadovanými vlastnostmi – proteinové inženýrství.

Studium závislosti afinitních změn při mutacích lektinu PA-III kombinací výše uvedených postupů odhalilo klíčovou roli aminokyselinového složení vazebného místa pro vazebné preference<sup>1</sup>. Studované mutanty byly rovněž vytvořeny *in silico* a využity pro dokovací experimenty, jejichž výsledky byly korelovány s experimentálními daty. Cílem projektu je na základě postupu “od známého k neznámému” vyvinout spolehlivou *in silico* metodu pro předpovídání neznámých, budoucích interakcí, a to jak z hlediska strukturního, tak termodynamického – usnadnit tak budoucí aplikace proteinového inženýrství.

Podporováno grantem GA ČR GD204/03/H016.

### LITERATURA

1. Adam J., Pokorná M., Sabin C., Mitchell E. P., Imberty A., Wimmerová M.: podáno k tisku.

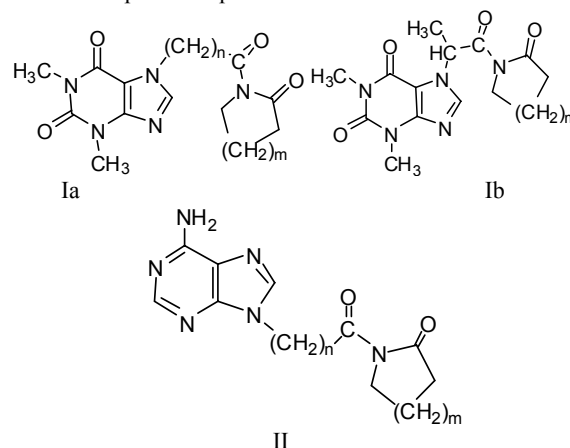
### DERIVÁTY THEOFYLINU A ADENINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

TOMÁŠ BARTL, PETRA STAŠKOVÁ, JAROSLAVA RAMBOUSKOVÁ, IVANA MILÁČKOVÁ, PETRA ŽÁDNIKOVÁ, RENATA JIŘÍKOVSKÁ a LUDEK BENEŠ

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno  
tbartl@vfu.cz

Neurodegenerativní choroby představují závažnou skupinu onemocnění centrální nervové soustavy. Velká pozornost je těmto onemocněním věnována v souvislosti s prudkým nárůstem výskytu v lidské populaci a často progresivním průběhem, který vede k postupnému úbytku kognitivních funkcí. U řady z nich je narušena schopnost správného úsudku, logického uvažování, schopnost orientace, v pokročilých stádiích dochází ke ztrátě kontaktu s realitou a celkovému rozpadu osobnosti<sup>1</sup>. Onemocnění končí smrtí pacienta, kauzální léčiva nebyla doposud vyvinuta.

Jako potenciální léčiva těchto onemocnění byla připravena skupina derivátů purinu. Sloučeniny odvozené od purinových bází theofylinu Ia ( $n=1-5$ ;  $m=1-3$ ), Ib ( $m=1-3$ ) a adeninu II ( $n=1-3$ ;  $m=1-3$ ) obsahují ve své molekule  $\omega$ -laktamový kruh, který je charakteristický pro celou řadu kognitivně zesilujících a antikonvulzivně působících léčiv. Délka acylového řetězce, který spojuje purinové jádro s laktamovým kruhem, ovlivňuje lipofilitu sloučenin a tím i distribuci těchto potenciálních léčiv v organismu. Při přípravě theofylinových a adeninových derivátů byly zvoleny odlišné syntetické postupy, neboť reaktivita a chemické vlastnosti výchozích purinových sloučenin jsou zcela rozdílné. Struktura připravených sloučenin byla potvrzena metodami NMR a IČ spektroskopie.



Na základě TLC na revezní fázi (RP-8), použití výpočetní techniky a chemických databází<sup>2</sup> byl u připravených theofylinových sloučenin učiněn odhad rozdělovacích koeficientů. Vybrané sloučeniny byly testovány na antioxidační efekt a aktivitu vůči aminopeptidasám a kaspasám, které do rozvoje neurodegenerativních chorob zasahují. Testované sloučeniny vykazaly mírnou inhibiční aktivitu vůči aminopeptidasám.

V souvislosti s přechodem od léčiv charakteru racemátů k opticky čistým enantiomerům byl připravený racemát sloučeniny Ib rozdělen za použití HPLC na chirální koloně s obsahem selektoru allobiohydrolasy a detekce UV-VIS na jednotlivé enantiomery.

### LITERATURA

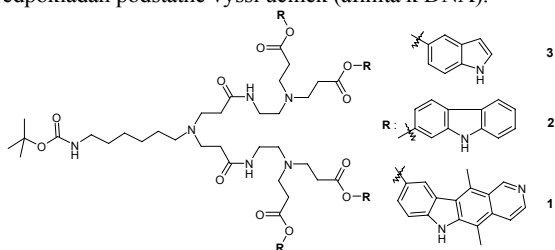
1. Tanzi R. E., Bertram L.: Cell 120, 545 (2005).
2. <http://146.107.217.178/lab/alogps/start.html>, staženo 1. listopadu 2006.

## MULTIVALENTNÍ DERIVÁTY ELLIPTICINU

**P. BAŠOVÁ<sup>a,b</sup>, K. KŘENEK<sup>a</sup>, R. GAŽÁK<sup>a</sup>,  
K. BEZOUŠKA<sup>b</sup> a V. KŘEN<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř Biotransformací, Mikrobiologický ústav AV ČR, 142 20 Praha 4; <sup>b</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Albertov 230, 128 40 Praha 2

Ellipticin (**1**) je cytostatikum, jehož deriváty jsou již v I. a II. fázi klinických testů. Pevládajícími mechanismy protinádorového účinku jsou *i*) interkalace do dvojšroubovicové struktury DNA, *ii*) inhibice topoizomerasy II a *iii*) selektivní inhibice fosforylace proteinu p53. Výhodou ellipticinu je jeho vysoká účinnost a poměrně nízká toxicita. Hematologická toxicita je prakticky nulová. Díky provedeným SAR studiím je nyní možné jeho strukturu dále optimalizovat. U multivalentních molekul nesoucích jako ligandy ellipticin, je předpokládán podstatně vyšší účinek (afinita k DNA).



Hlavní náplní této práce je příprava PAMAM dendrimerů 1. a 2. generace a jeho konjugátů se strukturálními analogy 9-hydroxyellipticinu - 5-hydroxyindolem (**3**) a 2-hydroxykarbazolem (**2**) a příprava 9-hydroxyellipticinu (Schéma 1) jako ligandu pro konjugaci s možností dalšího navázání celého konjugátu na proteiny. Hydroxylace ellipticinu v poloze C-9 nesnižuje jeho biologické účinky (dokonce zvyšuje), proto je možné tuto skupinu použít s výhodou pro konjugaci.

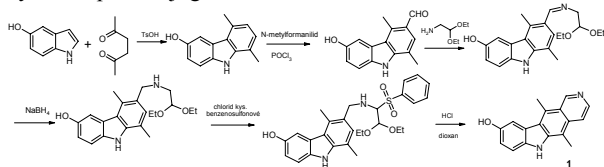


Schéma 1

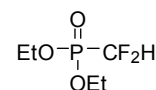
Tato práce byla podpořena granty GA AV ČR IAA400200503, MŠMT OC136 a IM 4635608802

DIFLUOROMETHYLFOSFONÁT JAKO (CF<sub>2</sub>H)- A (CF<sub>2</sub>)<sup>2</sup>- SYNTETICKÝ ANALOG

**PETR BEIER<sup>a</sup>, MIKHAIL ZIBINSKY<sup>b</sup> a G. K. SURYA PRAKASH<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup> Loker Hydrocarbon Res. Inst., University of Southern California, 837 Bloom Walk, Los Angeles, CA 90034-1661, USA beier@uochb.cas.cz

Selektivně fluorované sloučeniny hrají stále důležitější úlohu při přípravě nových moderních biologicky aktivních látek a funkčních materiálů<sup>1,2</sup>. Jedním z novějších typů fluorovaných funkčních skupin je difluoromethyl (-CF<sub>2</sub>H) a difluoromethylen (-CF<sub>2</sub>-), které mohou být použity při náhradě stericky a elektronicky blízkých skupin -OH nebo -CH<sub>2</sub>OH resp. -O- (lit.<sup>3-5</sup>). V současné době je nejefektivnější metodou při přípravě těchto typů látek nukleofilní difluoromethylace difluoromethyl fenylyl sulfonem (PhSO<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>H)<sup>6-8</sup>.



1

Diethyl difluoromethylfosfonát (**1**) byl rovněž použit jako syntetický analog (CF<sub>2</sub>H)- a (CF<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- skupin při reakci s karbonylovými sloučeninami a akylyl bromidy, Schéma 1.

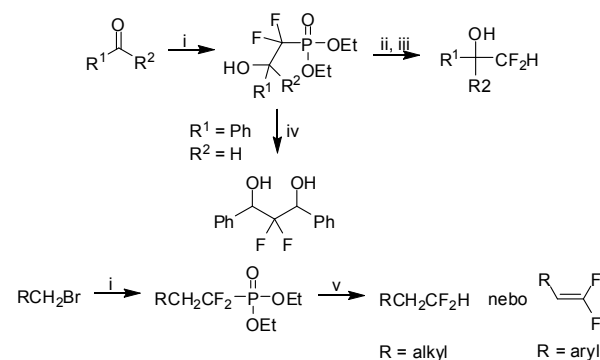


Schéma 1: *i*) **1**, LDA, *ii*) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, *iii*) LiOH, *iv*) báze, PhCHO, *v*) *t*-BuOK.

## LITERATURA

- Hiyama T. (Ed.): *Organofluorine Compounds, Chemistry and Applications*. Springer, New York 2000.
- Kirsch P.: *Modern Fluoroorganic Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- Sasson R., Hagooley A., Rozen S.: *Org. Lett.* 5, 769 (2003).
- Yudin A. K., Prakash G. K. S., Deffieux D., Bradley M., Bau R., Olah G. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1572 (1997).
- Erickson J. A., McLoughlin J. I.: *J. Org. Chem.* 60, 1626 (1995).
- Prakash G. K. S., Hu J., Mathew T., Olah G. A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 42, 5216 (2003).
- Prakash G. K. S., Hu J., Wang Y., Olah G. A.: *Org. Lett.* 6, 4315 (2004).
- Prakash G. K. S., Hu J., Wang Y., Olah G. A.: *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2218.

## IDENTIFYING PHOSPHORYLATION SITES IN THE RETINOBLASTOMA TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN MAT3

**KATEŘINA BIŠOVÁ<sup>a,b</sup> and JAMES G. UMEN<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Opatovický Mlyn, the Czech Republic;* <sup>b</sup>*The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA*

Retinoblastoma (RB) tumor suppressor related proteins are negative regulators of the cell cycle whose activity is thought to be controlled through phosphorylation by cyclin dependent kinases (CDKs). Although 16 phosphorylation sites have been mapped in human and mouse RB, the functional significance of individual phosphorylations remains unclear, and the role of RB phosphorylation in plants and green algae has not been carefully examined. The *Chlamydomonas* MAT3 gene encodes a RB homolog whose loss leads to premature cell cycle entry and supernumerous cell divisions. We have used in vivo labeling to show that MAT3 is a phosphoprotein, and are employing several strategies to identify its phosphorylation sites. Twelve tryptic peptides that contain either phospho-serine or phospho-threonine were detected from in vivo labeled MAT3, indicating that the protein is multiply phosphorylated. In parallel we have developed an in vitro kinase assay on recombinant MAT3 using cell extracts or partially purified cyclin dependent kinase preparations. In vitro phosphorylation of MAT3 is sensitive to the CDK inhibitor roscovitine, suggesting that CDKs are the major kinase activity for MAT3. Both mass spectrometry and phosphopeptide mapping were used to identify sites of phosphorylation on recombinant MAT3, and most of the in vitro sites match those seen in vivo. Moreover, kinase activity towards several sites on MAT3 appears to be cell cycle regulated, with increased activity present in post-Commitment and mitotic extracts. Efforts are now under way to confirm sites of phosphorylation by use of point mutations and deletions in recombinant MAT3. The functional significance of phosphorylation at different sites will be tested by introducing phosphoacceptor mutations into a MAT3 gene and assessing their ability to complement a mat3 deletion mutant.

#### ZVÝŠENÍ BIOSYNTÉZY LIGNANŮ BUNĚČNOU KULTUROU SCHISANDRA CHINENSIS PŘÍDAVKEM POLYMERNÍCH ADSORBENTŮ

**LENKA BŘEZINOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ SLANINA<sup>a</sup>,  
HELENA VLAŠINOVÁ<sup>b</sup>, IRENA BOHATCOVÁ<sup>b</sup>  
a LADISLAV HAVEL<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského nám. 2, 662 43 Brno;* <sup>b</sup>*Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
lbrezin@med.muni.cz*

Plody *Schisandra chinensis* se používají po staletí v zemích Dálného východu jako tonikum a antitusikum. Účinnými sloučeninami jsou lignany s unikátní strukturou odvozenou od dibenzo[a,c]cyklooktadienu. Tyto lignany vykazují široké spektrum biologických účinků, včetně

antivirové, antioxidační a hepatoprotektivní aktivity<sup>1</sup>. Některé lignany *S. chinensis* inhibují replikaci viru HIV *in vitro*. Nedávno bylo zjištěno, že lignan  $\gamma$ -schizandin účinně inhibuje P-glykoprotein, jehož zvýšená exprese je nejčastější příčinou rezistence na cytostatika<sup>2</sup>. Množství lignanů v plodech je poměrně nízké (přibližně 1 % sušiny) a skládá se nejméně z 30 různých lignanů<sup>3</sup>, jejichž obsah je velmi variabilní. Tyto okolnosti značně znevýhodňují rostlinný materiál jako zdroj pro získání čistých lignanů. Buněčné kultury *S. chinensis* mohou představovat výhodný zdroj těchto sekundárních metabolitů.

Kultury *S. chinensis*, odvozené z endospermu a nezralých zygotických embryí, byly pěstovány na mediu Murashige a Skoog a mediu VW5. Embryogenní kultury byly založeny na mediích s přísadkou růstových regulátorů (thidiazuron, 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina a benzylaminopurin)<sup>4</sup>. V naší práci jsme studovali možnost ovlivnění biosyntézy lignanů přísadkou dvou neutrálních polymerních adsorbentů, Amberlite XAD-2 (nepolární adsorbent) a Amberlite XAD-7 (středně polární adsorbent) do kapalného média během kultivace buněk. Analýza šesti hlavních lignanů (schizandrin, gomisin A, deoxyschizandrin, gomisin N,  $\gamma$ -schizandrin a wuweizisu C) byla provedena pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Pokud byly buněčné kultury inkubovány bez přísadky adsorbentů, většina lignanů byla lokalizována převážně intracelulárně (71–98 %). Přísadka polymerních adsorbentů zvýšil nejen množství lignanů lokalizovaných extracelulárně (z 2–29 % na 7–99,9 %), ale také výrazně zvýšil celkovou biosyntézu lignanů (3–130krát). Zatímco Amberlite XAD-7 snižoval růst některých kultur a to až o 40 %, Amberlite XAD-2 neovlivňoval růst kultur oproti kontrole. Zjistili jsme také rozdílnou selektivitu vazby lignanů na polymerní pryskyřice. Zatímco Amberlite XAD-2 zvyšoval celkovou produkci deoxyschizandrinu, který tvořil 86–94 % všech adsorbovaných lignanů, Amberlite XAD-7 zvyšoval zejména množství wuweizisu C, který zahrnoval 55–79 % všech adsorbovaných lignanů na polymerní pryskyřici.

Přísadka nepolárních polymerních adsorbentů je velmi efektivní prostředek k převedení lignanů do extracelulárního prostředí a ke zvýšení produkce těchto sekundárních metabolitů. Lignany adsorbované polymerní pryskyřicí pak mohou být snadno získány bez destrukce buněčné kultury, což je velkou výhodou vzhledem k pomalému růstu kultur.

*Tato práce je podporována grantem GA ČR 522/07/0995.*

#### LITERATURA

1. Hancke J. L., Burgos R. A., Ahumada F.: *Fitoterapia* 70, 451 (1999).
2. Qiangrong P., Wang T., Lu Q., Hu X.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 406 (2005).
3. Slanina J., Táborská E., Lojková L.: *Planta Med.* 63, 277 (1997).
4. Smíšková A., Vlašínová H., Havel L.: *Biol. Plant.* 49, 451 (2005).

## THE INCORPORATION OF BLOOD PLATELET CELLULAR PRION PROTEIN IN MEMBRANE RAFTS INDICATES ITS PHYSIOLOGICAL FUNCTION

**ADÉLA BROUČKOVÁ** and **KAREL HOLADA**

*Institute of Immunology and Microbiology, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Studničkova 7, 128 20 Prague 2  
Adela.Brouckova@lf1.cuni.cz*

Prion diseases, so called transmissible spongiform encephalopathies, are neurodegenerative diseases, which affect both humans and animals. The pathological prion protein PrP<sup>Sc</sup>, which is a conformationally altered isoform of the host cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>), is supposed to be the causative agent<sup>1</sup>.

PrP<sup>C</sup> is expressed on many cell types and also on blood components. The individual expression is highest in lymphocytes and monocytes, however, the total amount is higher in platelets and red blood cells<sup>2</sup>.

The lack of PrP<sup>C</sup> physiological function might be the fundamental of prion diseases, therefore it is a big challenge for scientists. Several studies have indicated that PrP<sup>C</sup> might have role in oxidative stress. The most studied is PrP<sup>C</sup> in nervous system, as it is obviously included in pathophysiology of prion diseases. Hence, it was proposed that PrP<sup>C</sup> might play a role in the physiology of neurons, namely neurite outgrowth and synaptic function. The function of PrP<sup>C</sup> in signalling events is also studied. Several authors suggested its involvement in signal transduction of lymphocytes and monocytes. Many signalling molecules could be found in special membrane compartments called membrane rafts. Membrane rafts are liquid-ordered microdomains rich in cholesterol and sphingolipids<sup>3</sup>. They also participate in platelet activation processes.

In present study we followed the localization of platelet PrP<sup>C</sup> in membrane rafts. Platelets were either resting or activated by thrombin receptor activating peptide (TRAP). We studied how the platelet activation affects the distribution of PrP<sup>C</sup> between raft and non-raft regions in cytoplasmic membrane of platelets and their organelles. For this purpose we isolated cytoplasmic membrane and organelles by differential centrifugation both from resting and activated platelets and subsequently we analyzed protein localization in rafts. Membrane rafts were isolated by density gradient centrifugation after their extraction from membrane using detergent Igepal CA-360. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) was used for cholesterol depletion and thus abolition of protein interaction with rafts. The presence of PrP<sup>C</sup> and control proteins known to associate with membrane rafts (CD59, CD36) was determined by Western blot. Platelets were also stained for fluorescence microscopy to observe PrP<sup>C</sup> pattern.

Our experiments have demonstrated that approximately one third of platelet PrP<sup>C</sup> is found in membrane rafts while the rest is not in raft fraction. Interestingly, cytoplasmic membrane and platelet organelles differed in this ratio. As for cytoplasmic membrane activation of platelets led to

increase of PrP<sup>C</sup> incorporated in rafts. Using cholesterol depletion we confirmed the specificity of PrP<sup>C</sup> localization in rafts. Finally, by fluorescence microscopy we have shown the punctuate staining of PrP<sup>C</sup> suggesting its clustering in membrane rafts.

Our data suggest that localization and behaviour of PrP<sup>C</sup> in membrane rafts might implicate its function in signalling cascades triggered in activated platelets.

*Supported by GA ČR 310/05/H533.*

1. Prusiner S. B.: *Brain Pathol.* 8, 499 (1998).
2. Holada K., Vostal J. G.: *Br. J. Haematol.* 110, 472 (2000).
3. London E., Brown D. A.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1508, 182 (2000).

## PROTEINY KARCINOMU PRSU METODOU SELDI-TOF MS

**KRISTÝNA BROŽKOVÁ, DANA KNOFLÍČKOVÁ, PAVEL BOUCHAL, RUDOLF NENUTIL, a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK**

*Masarykův onkologický ústav, Oddělení patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno*

Pokrok genomických a proteomických metod umožňuje posun medicíny k personalizovanému přístupu ve vztahu k fyziologii a genetickému pozadí konkrétního pacienta. Znalost kompletní sekvence lidského genomu umožňuje předpovědět dispoziční k určitému onemocnění, ale teprve rozšíření na funkční jednotky – proteiny – poskytuje komplexní obraz stavu daného jedince.

Analýza expresního profilu proteinů séra, plasmy, tkáně nebo moči může poskytnout široké spektrum informací o diagnóze, odpovídatosti na léčbu či monitorování progresu choroby. Technologie CIPHERGEN<sup>®</sup> založená na principu SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) je ideální nástroj pro identifikaci nových, specifických a citlivých biomarkerů v komplexních biologických vzorcích. Využití chromatografického povrchu čipů (iontoměniče, chelatační povrchy, hydrofobní povrchy aj.) pro specifickou vazbu částí proteinů z komplexní směsi v biologickém vzorku vede ke zjednodušení proteinového spektra, které je následně analyzováno a intenzita jednotlivých píků hodnocena statisticky.

V první fázi celé studie jsme optimalizovali lyzi tkáně, povrch čipu a nastavení měření. Analyzovali jsme 110 vzorků nádorové tkáně pacientek s diagnózou karcinomu prsu a 110 odpovídajících vzorků zdravé tkáně prsu. Celý soubor je charakterizován na běžně stanovené klinické znaky spojené s danou diagnózou. Získaná spektra v rozmezí 2 až 100 kDa byla kalibrována na hmotnostní standardy, intenzita byla normalizována dle celkového iontového proudu a detekovány píky o poměru signál/šum vyšší než 3. Statistická analýza byla provedena pomocí neparametrických testů Mann-Whitneyova resp. Kruskal-Wallisova (pro více

než dvě hodnoty kategorické proměnné), s cílem identifikovat píky se statisticky významným ( $p \leq 0,001$ ) vztahem ke klíčovým parametrům hodnoceným kategoricky (negativní – pozitivní, 1–2–3 atd.).

Z klasických prediktivních parametrů koreloval s přítomností estrogenového receptoru alfa pik o hmotnosti 4927 Da a dva píky v oblasti 8700 Da. Pik korelující samostatně s přítomností progesteronového receptoru nebyl identifikován. Korelace s přítomností proteinu cyklinu D1 byla potvrzena u piků 3398 Da, 7553 Da a také v oblasti 8700 Da. Oproti tomu nebyl nalezen žádný jednoznačně korelující pik s amplifikací genu pro cyklin D1, amplifikací genu *Her-2/neu* ani s přítomností proteinu Her-2. Při analýze parametrů gradingu byly nalezeny píky korelující s jadernou polymorfii (2318 Da a 2428 Da), s mitotickou aktivitou (2307 Da), ale žádný z piků nekoreloval s kvantitou tubulárních formací. Dále nebyly nalezeny píky korelující s expresí cytotkeratinu 5/6, MUC1, GCFP ani s velikostí nádoru nebo s přítomností uzlinových metastáz v době diagnózy. Vybrané píky byly dále purifikovány a postoupeny k identifikaci.

*Práce byla podpořena z finančních zdrojů IGA MZ ČR NR / 8338-3/2005 a MŠMT LC06035.*

## ČESKÉ LÉČIVÉ ROSTLINY JAKO MOŽNÉ ZDROJE ANTIOXIDANTŮ

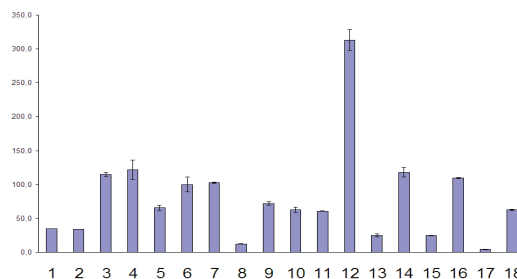
### LUCIE BUŘIČOVÁ a ZUZANA RÉBLOVÁ

*VŠCHT, Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 3,  
16628 Praha 6  
lucie.buricova@vscht.cz*

Součástí výzkumu antioxidantů je také hledání nových zdrojů těchto látek. Mezi bohaté zdroje přírodních antioxidantů patří i léčivé rostliny. Z tohoto důvodu byly vybrané české léčivé rostliny (v potravinářství použitelné bez omezení a květ černého bezu, použitelný pro výrobu čajových směsí do výše 30 % hmotnosti)<sup>1</sup> porovnány mezi sebou na základě jejich celkové antioxidační aktivity.

Antioxidační aktivita sedmnácti českých léčivých rostlin byla stanovena v suchých drogách ve vepřovém sádle pomocí přístroje Oxipres a ve vodných (Obr. 1) a ethanolových extraktech metodou zhášení radikálu DPPH (2,2-difeny-1-pikryl-hydrazylu). Ve vodných extraktech byly stanoveny také veškeré látky s redukčními vlastnostmi (metodou FIA s amperometrickou detekcí)<sup>2</sup>. Za hlavní metodu stanovení antioxidační aktivity byla zvolena metoda zhášení radikálu DPPH, neboť aktivity naměřené na přístroji Oxipres byly velmi nízké, na čemž se mohla, jako jeden z faktorů, podílet obtížná extrahovatelnost antioxidantů ze sušených drog přímo do sádla. Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH dobře korelovala s celkovým obsahem látek s redukčními vlastnostmi. Díky korelaci těchto dvou metod můžeme říci, že antioxidační aktivita extraktů studovaných léčivých rostlin je způsobena především primárními antioxidanty, které je možné stanovit

elektrochemickými metodami na základě jejich snadné oxidovatelnosti.



Obr. 1: Celková antioxidační aktivita (AA) vodných extraktů, naměřená metodou DPPH, v mg askorbové kyseliny na 1 g sušené drogy ( $\pm$  směrodatná odchylka). (1-heřmánek květ, 2-borůvka plod, 3-ostružina plod, 4-jahoda list, 5-hluchavka květ, 6-meduňka nať, 7-maliník list, 8-čekanka kořen, nať, 9-máta nať, 10-lípa květ, 11-černý bez květ, 12-zelený čaj, 13-jeřáb červený plod, 14-dobromysl nať, 15-rakytník plod, 16-mateřídouška nať, 17-fenykl plod, 18-šípek plod)

Extrakce látek s antioxidačními účinky, zhášejíci radikál DPPH, byla účinnější horkou vodou než ethanolom za teploty místnosti. Antioxidační aktivity obou typů extraktů spolu však silně koreluje. Významnou antioxidační aktivitu (stanovenou jak ve vodném, tak v ethanolovém extraktu) vykazovaly rostliny čeledi *Rosaceae* (list jahodníku lesního, list maliníku a list ostružiníku), dále pak rostliny čeledi *Lamiaceae* (nať meduňky, nať mateřídoušky, nať máty peprné, nať dobromysly a květ hluchavky), spolu s květem lípy (z čeledi *Tiliaceae*) a květem černého bezu (z čeledi *Loniceraceae*). I když tyto rostliny měly nižší antioxidační aktivitu než zelený čaj, mohou být považovány za dobré zdroje antioxidantů vhodné nejen pro přímou konzumaci, ale také pro obohacování potravin (jejich koncentrovanými extrakty) za účelem zvýšení nutriční hodnoty.

## LITERATURA

1. *Vyhláška č. 330/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny.* Sběrka zákonů 1997, částka 110, str. 6713.
2. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* 98, 174 (2004).

## PYROSEQUENCING AS A TOOL FOR WHOLE GENOME SEQUENCING OF *Treponema pallidum* SUBSPECIES

**DARINA ČEJKOVÁ<sup>a</sup>, PETRA MATĚJKOVÁ<sup>a</sup>,  
MICHAL STROUHAL<sup>a</sup>, MARIE ZOBANÍKOVÁ<sup>a</sup>,  
DAVID ŠMAJS<sup>a,b</sup>, and GEORGE M. WEINSTOCK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, CZ; <sup>b</sup>Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

*Treponema pallidum* includes several obligate human pathogens. *T. p. pallidum* is an agent of sexually transmitted syphilis, *T. p. pertenue* and *T. p. endemicum* causes yaws and endemic syphilis, respectively. Diseases caused by these subspecies are quite distinct, although at the DNA level the bacteria are nearly indistinguishable, being > 99% identical based on hybridization experiments and whole genome fingerprinting results.

Pyrosequencing (454 sequencing) is a massively-parallel sequencing-by-synthesis system. In this study, genomic DNA of *T. p. pertenue* CDC-2 was completely sequenced using 454 technology. In the first step, DNA (10 ng) was amplified using REPLI-g kit (QIAGEN) leading to 10.24 µg of amplified DNA. In the following step, 6 µg of whole genome amplified DNA was used for pyrosequencing. The total number of reads was 464,757 assembled in 1,669 contigs. The blastn analysis revealed 74 contigs homologous to *Treponema*. N50 contig length was 52 kb. Average read coverage for *T. pallidum* contigs was 36x. Obtained CDC-2 contigs covered 98.63 % of the genome sequence of *T. p. pallidum* Nichols strain (AE000520).

Seventy-four gaps found in the genome assembly varied between 1 bp and 5,963 bp. Gaps were clustered in 50 regions and amplification primers for these regions were designed using Primer3 software. The PCR amplified regions were sequenced by standard Sanger method. 28 gaps were successfully closed by this approach. Ten remaining gaps require primer walking approach and twelve require cloning of PCR product and sequencing of resulting clones. The CDC-2 genome (140,000 bp, i.e. 12 %) was compared to another yaws strain, Samoa D. Based on these preliminary results, more than 250 SNPs and approximately 200 single nucleotide and other short indels are expected in the complete genome sequence of CDC-2 strain.

Based on the analysis of assembled contigs, pyrosequencing approach showed limitations in highly repetitive regions and in homopolymer stretches. Discovery of sequence differences among different *T. pallidum* strains will lead to characterization of intra- and intersubspecies *Treponema pallidum* variability and to identification of virulence determinants.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 310/07/0321) and the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NR/8967-4/2006).*

#### ANALÝZA -1149 G/T SNP EXTRAHYPOFYZÁRNÍHO PROMOTORU GENU *PRL* U DIABETIKŮ I. TYPU

**PAVLÍNA ČEJKOVÁ<sup>a</sup>, MARKÉTA FOJTÍKOVÁ<sup>b</sup>, CTIBOR DOSTÁL<sup>b</sup>, LUDMILA TREŠLOVÁ<sup>c</sup>, JOSEF MAREK<sup>d</sup> a MARIE ČERNÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Odd. buněčné a molekulární biologie, 3. LF; <sup>b</sup>Revmatologická klinika, 1. LF; <sup>c</sup>Diabetologické centrum, 3. LF a FNKV; <sup>d</sup>III. interní klinika, 1. LF a FNKV, Univerzita Karlova Praha

Prolaktin (PRL) je polypeptidový hormon produkovaný laktotrofními buňkami adenohipofýzy. Vedle svých endokrinních účinků PRL podobně jako cytokiny vykazuje schopnost ovlivnit maturaci a diferenciaci imunitních buněk. Zvýšené hladiny PRL (hyperprolaktinémie) byly detekovány u některých autoimunitních chorob, jako jsou systémový lupus erythematosus (SLE), revmatoidní artritida (RA) a psoriatická artritida (PsA). Expres prolaktinu však byla detekována také u extrahypofyzárních tkání včetně imunitních T lymfocytů a monocytů. Tato extrahypofyzární produkce je řízena alternativním promotorem, kde se v pozici -1149 nachází jednonukleotidový polymorfismus G/T. Vyšší hladiny exprese PRL mRNA v lymfocytech korelují s výskytem G alely.

Cílem této práce bylo zjistit potenciální úlohu PRL v patogenezi autoimunitního diabetes a určit distribuci -1149 G/T polymorfismu extrahypofyzárního promotoru PRL genu u T1DM pacientů.

Frekvence alel a genotypů -1149 G/T polymorfismu extrahypofyzárního promotoru prolaktinového genu jsme sledovali u středočeské populaci diabetiků (N=49) diagnostikovaných na základě stávajících kritérií WHO. Jako kontrolní soubor byli použiti dobrovolní dárci krve (N=104). PCR-RFLP: Genomická DNA byla izolována z periferní krve pomocí QiaAmp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Německo). K detekci alel a genotypů -1149 G/T SNP PRL byla použita metoda PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) s originálně navrženými oligonukleotidy. PCR produkty byly štěpeny XapI restrikční endonuklasou, výsledné fragmenty separovány elektroforeticky na 4 % agarosovém gelu.

Genotypové a alelové frekvence -1149 G/T polymorfismu extrahypofyzárního promotoru prolaktinového genu se neliší mezi diabetickými pacienty a kontrolní skupinou: T1DM: GG = 40,8 %, GT = 40,8 %, TT = 18,4 %; kontroly: GG = 40,4 %, GT = 41,3 %, TT = 18,3 %. -1149 G/T polymorfismus extrahypofyzárního promotoru prolaktinového genu není asociovaný s autoimunitním T1DM. Zdá se tedy, že tento polymorfismus hraje roli pouze v systémových a nikoliv orgánových autoimunitních onemocněních.

*Tato studie je součástí širšího projektu a byla finančně podpořena Výzkumným záměrem Ministerstva školství a mládeže MSM 0021620814: Prevence, diagnostika a terapie diabetes mellitus, metabolických a endokrinních poškození.*

#### OPPOSITE EFFECTS OF TWO ZINC(II) DITHIOCARBAMATES ON NFκB PATHWAY

**BORIS CVEK<sup>a</sup>, ZDENĚK DVOŘÁK<sup>a</sup>, JAN TARABA<sup>b</sup>, LUKÁŠ MÜLLER<sup>c</sup>, RADIM VRZAL<sup>a</sup>, and JITKA ULRICOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Dept Med. Chem. Biochem., Medical Faculty, Palacký University, Olomouc; <sup>b</sup>Dept Chem., Faculty of Science, Masaryk University, Brno; <sup>c</sup>Dept Anal. Chem., Faculty of Science, Palacký University, Olomouc  
cvekb@seznam.cz



Inhibiting NFκB activation in anticancer and antiinflammatory therapy is of topical interest. Current research in molecular biology has dramatically advanced in the understanding of the cellular events involved in NFκB induction. Dithiocarbamates, in particular diethyldithiocarbamate and pyrrolidindithiocarbamate, have been known and widely used as strong inhibitors of NFκB signaling pathway for more than ten years. Their activity is frequently thought to be due to chelating of zinc or copper present in serum supplemented in the culture medium.

Zinc(II) diethyldithiocarbamate (Et<sub>2</sub>Zn) and zinc(II) dibenzylidithiocarbamate (Bz<sub>2</sub>Zn) were prepared by direct synthesis in aqueous milieu. They were structurally characterized by X-ray analysis (solid phase) and mass spectrometry (aqueous conditions). Et<sub>2</sub>Zn and Bz<sub>2</sub>Zn both in 20 μM concentration were applied to HeLa cells. The status of NFκB signaling was assessed as nuclear translocation of p65 subunit. Surprisingly, Et<sub>2</sub>Zn activated NFκB pathway, while TNF-α dependent activation of NFκB was inhibited by Bz<sub>2</sub>Zn. Our results are preliminary and further analyses comprising gene reporter assays will be performed.

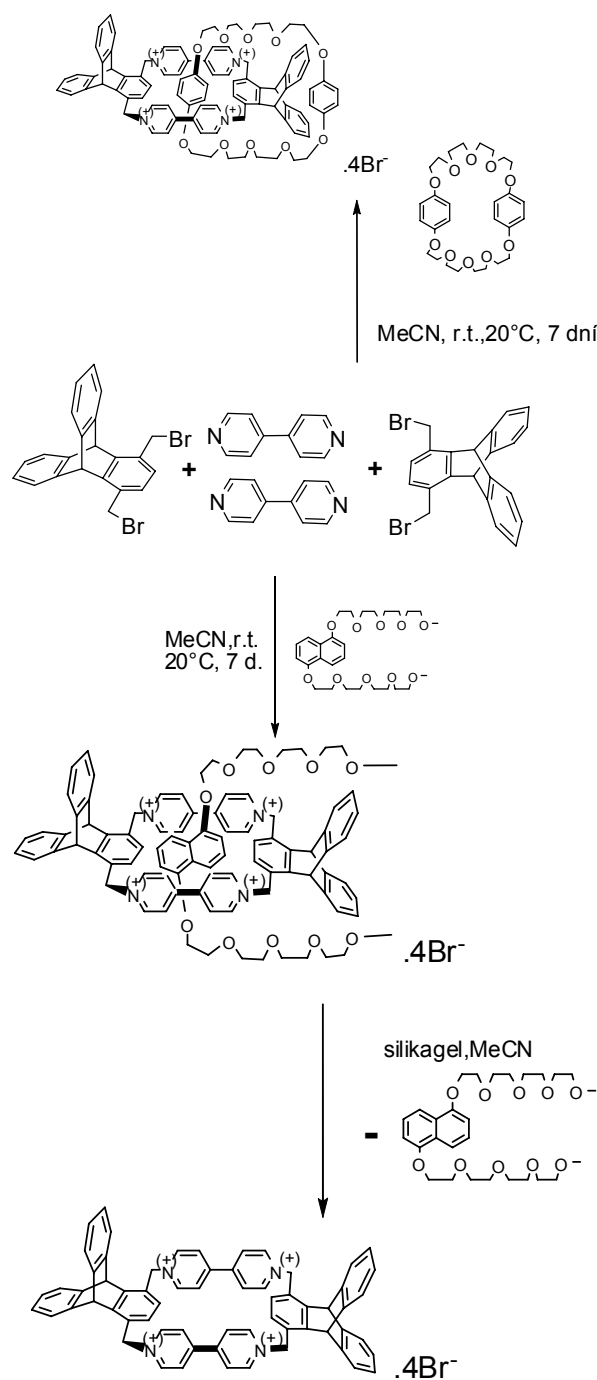
*This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM 6198959216).*

### ELEKRONOVĚ DEFICITNÍ TRIPTYCENOVÉ CYKLOFANY: STRUKTURA A VLASTNOSTI

**VÁCLAV DEKOJ<sup>a</sup>, MARTIN BĚLOHRADSKÝ<sup>a</sup>,  
DETLEF SCHROEDER<sup>a</sup> a IVANA CÍSAŘOVÁ<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Katedra organické chemie PŘF UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2  
vaclav.dekoj@seznam.cz

Bipyridylové cyklofany s inkorporovaným triptycenovým skeletem představují zajímavé stavební bloky pro výstavbu supramolekul. Metodami templátově řízené syntézy byla připravena homologická řada [2]katenanů obsahujících triptycenový cyklofan jako jeden z makrocyclů katenanu. Mobilita jednotlivých cyklů v katenanech byla sledována metodami NMR a porovnána s vlastnostmi katenanu připraveného ve skupině prof. Stoddarta. Samostatné triptycenové cyklofany jsou elektronově chudé a snadno tvoří inkluzní *charge-transfer* komplexy s elektronově bohatými molekulami. Triptycenové cyklofany také vykazují zajímavé vlastnosti v oblasti studia fragmentace polykationických molekul v plynné fázi metodami hmotnostní spektroskopie.



### PŘÍPRAVA TRITERPENOIDŮ SUBSTITUOVANÝCH NA KRUHU B A STUDIUM JEJICH KONFORMACE

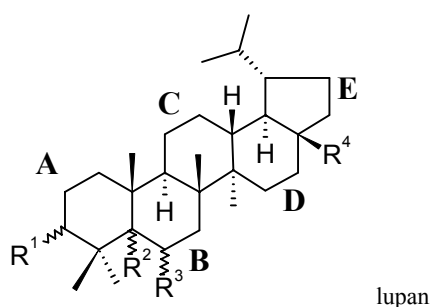
**MARTIN DRAČÍNSKÝ a JAN SEJBAL**

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

V přírodě se běžně vyskytují tetra- a pentacyklické triterpeny odvozené od více než 40 skeletů<sup>1,2</sup>. V nedávné době byla u některých derivátů zjištěna významná anti-HIV a protinádorová aktivita. Některé polohy jsou u triterpenů získaných z přírodního materiálu substituovány běžně, jiné vzácně. Velmi vzácně se vyskytují triterpeny substituované na kruhu B. U některých derivátů lupanu se substituentem na kruhu B byla nalezena zajímavá biologická aktivita (např. antibakteriální<sup>3</sup>, hepatoprotektivní<sup>4</sup>, protinádorová<sup>5</sup>).

Syntéza triterpenoidů se substituentem na kruhu B je poměrně obtížná, protože kruh B je od ostatních částí skeletu oddělen kvartérními uhlíky, které nelze běžnými chemickými reakcemi “překročit”. V této práci byla zvolena strategie částečného odbourání kruhu A a jeho následné dobudování se současným zavedením dvojné vazby do kruhu B. Výchozí látkou byl betulín, který lze snadno izolovat z březové kůry. Jedenáctistupňovou syntézou byl připraven lup-5-en-3,28-diol. Dvojná vazba byla poté hydroborována a ze vzniklého hydroxyderivátu byla připravena série 16 látek s různými kyslíkatými substituenty na kruhu B (cit.<sup>6</sup>).

U některých nově připravených látek byla studována konformace kruhu A. Je zajímavé, že substituent na kruhu B ovlivňuje i konformaci kruhu A. Konformace kruhu A byla studována pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie (sledováním vicinálních interakčních konstant) a pomocí molekulového modelování. Kromě židlíčkové konformace byly nalezeny i dvě různé zkřížené vaničkové konformace. Výsledky molekulového modelování jsou ve velmi dobré shodě s experimentálními daty.



#### LITERATURA

1. Connolly J. D., Hill R. A.: *Meth. Plant Biochem.* 7, 331 (1991).
2. Mahato S. B., Nandy A. K., Roy G.: *Phytochemistry* 31, 2199 (1992).
3. Schuhly W., Heilmann J., Calis I., Sticher O.: *Planta Med.* 65, 740 (1999).
4. Adnyana I. K., Tezuka Y., Banskota A. H., Tran K. Q., Kadota S.: *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1328 (2000).
5. Kouzi S. A., Chatterjee P., Pezzuto J. M., Hamann M. T.: *J. Nat. Prod.* 63, 1653 (2000).
6. Dračínský M., Hybelbauerová S., Sejbál J., Buděšínský M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 1131 (2006).

#### SYNTHESIS AND ANTI-TUBERCULAR ACTIVITY OF NEW ISONICOTINOYL HYDRAZONE DERIVATIVES

J. M. FÉRRIZ, J. VINŠOVÁ, A. IMRAMOVSKÝ, and E. VAVŘIKOVÁ

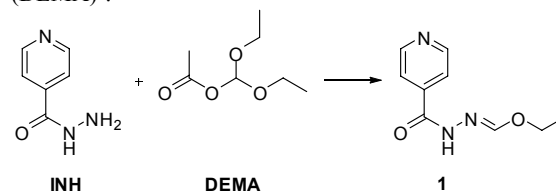
Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
ferriz@faf.cuni.cz

Isonicotinyl hydrazide (Isoniazid, INH) as a first-line anti-tubercular drug is widely applied in combination with other drugs such as Rifampicine, Pyrazinamide, Ethambutol for the treatment of tuberculosis (TB). Modification of this simple molecule is still up to date and has been the focus of the work for several research groups with the aim of improving biological activity and decreasing resistance<sup>1</sup>.

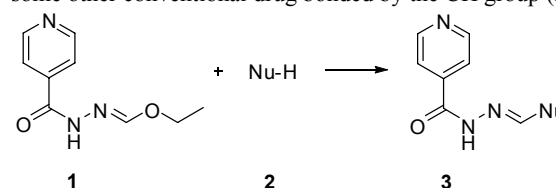
Synergetic act of INH and INH hydrazone is described in literature<sup>2</sup>. This fact led us to prepare completely a new type of isonicotinoyl hydrazone series, where the hydrazone part is another biological active center.

This new type of molecule can be considered as a double active substance that can play the role of a prodrug with a prolonged liberation, where the hydrazone and the components involved in it, can also act synergetically.

The first step was the synthesis of the hydrazone **1** that is easily available from INH and diethoxymethyl acetate (DEMA)<sup>3</sup>.



The ethoxy group in compound **1** can be substituted by nitrogen nucleophiles like INH, PZA, PAS, some quinolones or sulfonamides etc. (**2**) to form products containing INH and some other conventional drug bonded by the CH group (**3**).



Some of the mentioned products (**3**) were tested *in vitro* for their antitubercular activity at Hansen's disease Center (Colorado State University) as well as in The National Reference Laboratory for *Mycobacterium kansasii*. The stabilities of these compounds were tested by means of a RP-HPLC method due to their decomposition in water-acetonitrile solution.

These compounds show very good activity against non tubercular strains in comparison with isoniazid as an internal standard. In view of this fact, active research of this topic continues.

*This work was financially supported by the Research project MSM 002162082 and GAUK 285/2006/B-CH/FaF.*

## REFERENCES

1. Vinsova J., Imramovsky A., Jampilek J., Ferriz M. J., Dolezal M.: *Curr. Med. Chem.* (2007) under review.
2. De Logu A., Onnis V., Saddi B., Congiu C., Schivo M. L., Cocco M. T.: *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 275 (2002).
3. Košmrlj B., Koklič B., Polanc S.: *Acta Chim. Slov.* 43, 153 (1996).

### AKTIVITY ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ V ROSTLINÁCH TABÁKU SE ZVÝŠENOU HLADINOU PROLINU STRESOVANÝCH SUCHEM NEBO TEPLOTNÍM ŠOKEM

**ZUZANA FRÝDLOVÁ<sup>a,b</sup>, NAĎA WILHELMOVÁ<sup>b</sup>, MARIE HAVLOVÁ<sup>c</sup> a RADKA VAŇKOVÁ<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Univerzita Karlova, PŘF, Katedra fyziologie rostlin, Albertov 6, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav exp. botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6, <sup>c</sup>Ústav exp. botaniky AV ČR, Rozvojová 236, 165 00 Praha 6, *Lysolaje frydlova@ueb.cas.cz*

Rostliny v přírodních podmínkách jsou často vystavené nepříznivým vlivům, v letním období zejména suchu a vysoké teplotě. Tyto stresory nepříznivě ovlivňují růst a vývoj rostliny a v neposlední řadě i výnosy. Stresové reakce jsou doprovázeny zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), které oxidací narušují rovnováhu buňky. K udržení stability buňky slouží zejména antioxidační enzymatický a neenzymatický systém, účastníci se odstraňování ROS. Jiným mechanismem je syntéza osmoticky aktivních látek, např. prolinu, jako adaptace na stres. Využili jsme rostliny *Nicotiana tabacum* (wild type - WT) a transgeniční se zvýšenou produkcí prolinu (M51) pro studium odpovědi enzymatického antioxidačního systému na abiotický stres a následné zotavení. Rostliny byly 10 dní stresovány suchem. Při teplotním šoku byla zvýšena kultivační teplota na 40 °C po 6 hodin. Vzorky zotavených rostlin byly odebrány 24 hodin po ukončení stresu. Enzymatická aktivita v extraktech cytosolických proteinů z listů a kořenů superoxidismutasy (SOD), askorbátperoxidasy (APX) a glutathionreduktasy (GR) byla měřena spektrofotometricky, aktivita katalasy (CAT) byla určena pomocí kyslíkové elektrody. Byly zjišťovány zvláště aktivity v horním a dolním listovém patru a kořenech.

Odpovědi antioxidačních enzymů záleží jednak na jednotlivých částech rostlin i na stresu. Aktivita APX v listech kontrol působením obou stresů vzroste, kdežto v transgeničních klesá. V kořenech stresy vyvolají jen velmi malé změny aktivity APX. Aktivita katalasy v kořenech nebyla detekována vůbec. Po HS aktivita CAT klesá ve všech listech obou typů tabáku, po suchu roste a to i po recovery. Aktivita SOD v kontrolách po HS klesá, naopak v transgeničních roste. Vlivem sucha se mění jen v dolním patru listů, v horním se nemění. Po recovery ve všech listech

u obou typů tabáku aktivita SOD klesá. V kořenech je aktivita SOD největší a účinkem stresů se příliš nemění. Aktivita GR v podmínkách sucha se v listech obou rostlin výrazně zvýšila, po teplotním šoku naopak klesá, po zotavení se aktivita GR v dolních listech snížila a v horních listech mírně zvýšila. Kromě SOD jsou působením stresů do větší míry ovlivněny aktivity v listech ve srovnání s kořeny. HS často působí inaktivaci enzymů, účinkem sucha aktivity obecně rostou. Po zotavení transgeničních rostlin aktivity CAT a APX v horní části rostliny a v kořenech vzrostly. Ve WT se po zotavení aktivity enzymů zvyšují pouze v kořenech.

Zvýšená hladina prolinu ovlivnila odpovědi aktivit antioxidačních enzymů, prolinu zřejmě zasahuje do stresových odpovědí rostlinné buňky. Lze usuzovat, že transgeniční rostliny byly méně postiženy stresovými podmínkami, v důsledku čehož byly schopny po ukončení stresu obnovit ve vyšší míře antioxidační enzymatický systém.

*Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu č. 206/06/1306, financovaného GA ČR.*

### VLIV MASTNÝCH KYSELIN NA PROLIFERACI A VIABILITU PANKREATICKÝCH BETA BUNĚK

**VLASTA FÜRSTOVÁ, TEREZA KOPSKÁ a JAN KOVÁŘ**

*Oddělení buněčné a molekulární biologie ÚBBMB, 3. LF Univerzity Karlovy, Ruská 87, 100 00 Praha 10 vlasta.furstova@tiscali.cz*

Chronicky zvýšená hladina mastných kyselin (MK) v krvi přispívá ke ztrátě pankreatických beta buněk u onemocnění diabetes mellitus 2. typu a to zejména mechanismem apoptózy. Cytotoxicita MK u pankreatických beta buněk závisí pravděpodobně na délce jejich uhlíkového řetězce a stupni jejich saturace. Cílem práce bylo porovnat vliv různých nasycených a nenasycených MK (kyselina palmitová a stearová-nasycené, kyselina palmitolejová a olejová-cis dvojná vazba, kyselina elaidová-trans dvojná vazba, kyselina linolová-dvě dvojně vazby) na proliferaci a viabilitu beta buněk lidské linie NES2Y.

Pro testování vlivu MK jsme použili bezsérová, chemicky definovaná média umožňující přesně nastavit koncentrace jednotlivých mastných kyselin. Buňky linie NES2Y jsme inokulovali do jamek 96-jamkové destičky a nechali přisednout 24 hodin. Poté jsme vyměnili normální kultivační médium za médium obsahující jednotlivé mastné kyseliny vázané na bovinní sérový albumin (BSA) v následujících poměrech: 0,03 mM:2 % BSA, 0,1 mM:2 % BSA, 0,3 mM:2 % BSA, 1 mM:2 % BSA a 3 mM:5 % BSA. Kontrolní buňky jsme kultivovali v médiu obsahujícím 2 % a 5 % BSA. Po 48 a 96 hodinách kultivace jsme stanovili počet živých buněk po barvení trypanovou modří.

Zavedli jsme experimentální systém založený na bezsérových a chemicky definovaných médiích, který je vhodný pro studium vlivu mastných kyselin na beta buňky *in vitro*. U nasycených MK, tj. kyseliny palmitové a stearové, jsme zjistili výrazný vliv na proliferaci a viabilitu v závislosti

na aplikované koncentraci mastné kyseliny. Po 48 hodinách byl počet buněk při koncentraci 0,3 mM snížen oproti kontrole o 52 % u kyseliny palmitové a o 66 % u kyseliny stearové a téměř 100 % buněk kultivovaných s koncentracemi 1 mM a 3 mM bylo mrtvých. Nenasycené MK s *cis* dvojnou vazbou (kyselina palmitolejová, olejová a linolová) neměly v tomto časovém intervalu výraznější vliv na proliferační aktivitu s výjimkou nejvyšší použité koncentrace (3 mM), kde byl zřejmý pokles počtu buněk oproti kontrole (o 20–60 % v závislosti na použité MK). Inhibice proliferační aktivity vysokými koncentracemi *cis* nenasycených MK ve srovnání s kontrolou byla markantnější po 96 hodinách kultivace. Počet buněk poklesl oproti kontrole o 45–75% u koncentrace 1 mM a o 50–85% u koncentrace 3 mM v závislosti na použité MK. Efekt *trans* MK kyseliny elaidové byl odlišný v porovnání s jejím *cis* protějškem kyselinou olejovou. Nástup inhibičního působení na proliferaci se zde projevil po 96 hodinách působení již u koncentrace 0,1 mM, kdežto v případě kyseliny olejové až u koncentrace 1 mM.

Inhibice proliferace a indukce buněčné smrti u pankreatických beta buněk linie NES2Y vyvolané působením nasycených MK byly výrazně vyšší než po působení nenasycených MK. Účinné koncentrace byly přibližně 10x nižší a nástup účinku se projevil po kratší době kultivace. Naše výsledky jsou v souladu s některými literárními údaji o odlišném působení nasycených a nenasycených MK na pankreatické beta buňky. Rozdíl v účinku kyseliny elaidové a olejové poukazuje na možnost vlivu *cis* a *trans* izomerie dvojně vazby na biologické účinky MK.

Zvýšená hladina glukosy a mastných kyselin jsou považovány za hlavní spouštěcí mechanismy ztráty beta buněk u DM2T.

Cytotoxicita MK u pankreatických beta buněk závisí pravděpodobně na délce jejich uhlíkového řetězce a stupni jejich saturace. Přesné molekulární mechanismy, kterými indukují buněčnou smrt, však nejsou známe. Na modelu linie lidských pankreatických beta buněk chceme porovnat vliv různých nasycených a nenasycených MK: palmitová a stearová (nasycené), palmitolejová a olejová (*cis* dvojná vazba), elaidová (*trans* dvojná vazba), linolová (dvě dvojně vazby). Zároveň chceme přispět k poznání molekulárních mechanismů indukce buněčné smrti těmito MK. Zaměříme se hlavně na roli mitochondriální dráhy indukce apoptózy. Budeme sledovat aktivaci exekučních a iniciačních kaspas, případně jiných typů proteas, uvolňování proapoptotických faktorů z mitochondrií (cytochrom c atd.), změny mitochondriálního membránového potenciálu a změny exprese a buněčné lokalizace proteinů rodiny Bcl-2. Získané poznatky přispějí nejen k pochopení mechanismů indukce buněčné smrti MK u beta buněk, ale také by mohly přispět k nalezení nových způsobů terapie DM2T založených na inhibici apoptózy těchto buněk.

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

## MONOCHLORINATED PHENOLS STUDIED BY ELECTROCHEMICAL QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE (EQCM)

**MATILDA GERNÁTOVÁ a PAVEL JANDERKA**

*Institute of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
mgernatova13@yahoo.co.uk, janderka@chemi.muni.cz*

The quantitation of phenolic compounds in environmental, industrial and food samples is currently of great interest. The electrooxidation of phenols has thus received considerable attention in connection with the development of voltammetric and amperometric schemes for their monitoring<sup>1–4</sup>. Advanced oxidation processes and other methods can be also used for study of degradation and oxidation processes of phenols<sup>5,6</sup>. Unfortunately, the oxidation of phenolic compounds at solid electrodes produces phenoxy radicals which couple to form a passivating polymeric film on the electrode<sup>7–9</sup>. The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) allows real-time measurements of electrochemically induced mass changes at electrode surfaces. Such dynamic monitoring of instantaneous mass changes offers great promise for investigating the kinetics and mechanism of numerous potential-controlled surface reactions<sup>3,7,10</sup>.

An electrochemical quartz crystal microbalance model RQCM 603200 (Maxtek INC., California, USA) with a 5 MHz AT-cut quartz crystal was used. A three-electrode compartment cell with platinum electrode as a working electrode, reversible hydrogen electrode as a reference electrode and Pt sheet as a counter electrode were used. EQCM was connected with Autolab potentiostat (Ecochemie, Netherlands) used for I/E data recording. The solutions were deaerated with argon 5.0 (Messer, min. 99.999 vol. %) at 1 atm. pressure. 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used as a supporting electrolyte. The studied monochlorophenols (CPs) were *o*-CP, *m*-CP and *p*-CP, each obtained from Merck and used as received. We also studied chlorobenzene as a parent compound.

*This work was supported by research project INCHEMBIOL No. 0021622412 from the Ministry of Education, Youth and Sport.*

## REFERENCES

- Gernátová M., Janderka P.: Chem. Listy 100, 877 (2006).
- Ežerskis Z., Jusys Z.: J. Appl. Electrochem. 31, 1117 (2001).
- Ureta-Zañartu M. S., Bustos P., Diez M. C., Mora M. L., Gutiérrez C.: Electrochim. Acta 46, 2545 (2001).
- Cañizares P., García-Gómez J., Sáez C., Rodrigo M. A.: J. Appl. Electrochem. 34, 87 (2004).
- Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M. A., Giménez J., Esplugas S.: Appl. Catal., B 47, 219 (2004).
- Polcaro A. M., Palmas S.: Ind. Eng. Chem. Res. 36, 1791 (1997).

7. Ežerskis Z., Stalnonis G., Jusys Z.: *J. Appl. Electrochem.* 32, 49 (2002).
8. Muna G. W., Tasheva N., Swain G. M.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 3674 (2004).
9. Codognoto L., Machado S. A. S., Avaca L. A.: *J. Appl. Electrochem.* 33, 951 (2003).
10. Wang J., Jiang M., Lu F.: *J. of Electroanal. Chemistry* 444, 127 (1998).

## STUDY OF INVOLVEMENT OF CELLULAR PRION PROTEIN IN ERYTHROPOESIS IN MICE

**HANA GLJEROVÁ<sup>a</sup>, MARTIN PANIGAJ<sup>a</sup>,  
JAN ŽIVNÝ<sup>b</sup> and KAREL HOLADA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague;* <sup>b</sup>*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague*

The essential event in pathology of prion diseases is conversion of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) to its conformational isomer-abnormal infectious prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). Four cases of prion transmission by blood transfusion have been recently reported. However, the mechanism of prion transmission by blood and a physiological function of PrP<sub>c</sub> in blood cells remain unclear. PrP<sub>c</sub> is expressed on CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells and its expression is regulated during blood cell differentiation. Interestingly, the expression of erythroid cell specific  $\alpha$ -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is downregulated in patients suffering from prion infection. AHSP is expressed in erythroid cells where it acts as a chaperone preventing precipitation of  $\alpha$ -globine subunits. These facts suggest connection between erythropoiesis and prion pathogenesis.

The aim of our study was to find if PrP<sub>c</sub> plays a role in erythropoiesis. An acute haemolytic anemia was induced in mice by intra peritoneal (i.p.) administration of phenylhydrazine (PHZ) in dose of 80 mg/kg. The course of anemia was studied in mice with normal expression of PrP<sub>c</sub> (wild type, WT) and PrP<sub>c</sub> knock out mice (PrP<sup>-/-</sup>). The effect of PHZ on the erythropoiesis was evaluated by analysis of hematocrit (HCT) and erythropoietin (EPO) levels in plasma and kidney. EPO expression in kidney was analysed by quantitative RT-PCR. As an endogenous control 18S rRNA was used. Levels of EPO in plasma were evaluated using sandwich ELISA, HCT was counted manually. A rapid decrease in HCT was observed in both WT and PrP<sup>-/-</sup> mice during first day after induction of anemia. Drop of HCT was followed by increase in expression of EPO mRNA in kidneys and higher plasma levels of EPO. PrP<sup>-/-</sup> mice showed significantly lower HCT during third to fifth day after induction of anemia and higher production of EPO mRNA and higher EPO levels in plasma suggesting involvement of PrP<sub>c</sub> expression in erythropoiesis. To confirm the role of PrP<sub>c</sub> in erythropoiesis the effect of PHZ in PrP<sup>-/-</sup> mice and Tga20 mice (PrP<sup>-/-</sup> mice with 20 copies of Prnp gene randomly reintroduced) was compared. Tga20 mice displayed lower decrease of HCT and lower production of EPO in

comparison to PrP<sup>-/-</sup> mice. The course of anemia induced by PHZ was significantly deeper in PrP<sub>c</sub><sup>-/-</sup> mice. This phenomenon could be explained as a result of lower ability of PrP<sub>c</sub><sup>-/-</sup> mice to deal with the oxidative stress caused by PHZ. Reintroduction of PrP<sub>c</sub> gene in Tga20 mice rescued the animals from severe anemia. Our results suggest that PrP<sub>c</sub> may play a supporting role in the erythropoiesis.

Supported by: GA ČR 310/04/0419, 310/05/H533, MSM 0021620806

## POUŽITÍ SQUARE WAVE VOLTAMETRIE PRO STANOVENÍ FLAVONOIDŮ A JEJICH TESTY JAKO POTENCIONÁLNÍCH INDUKTORŮ CYTOCHROMŮ P450

**PAVEL HANUŠTIAK<sup>a</sup>, PETR HODEK<sup>b</sup>,  
RADKA MIKELOVÁ<sup>c</sup>, VOJTĚCH ADAM<sup>d</sup>,  
MIROSLAVA BEKLOVÁ<sup>a</sup>, LADISLAV ZEMAN<sup>e</sup>,  
a RENÉ KIZEK<sup>d,\*</sup>**

<sup>a</sup>*Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE, VFU, Palackého 1-3, 612 42 Brno;* <sup>b</sup>*Katedra biochemie, PŘF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha;* <sup>c</sup>*Katedra teoretické a fyzikální chemie, PŘF MU, Kotlářská 37, 611 37, Brno;* <sup>d</sup>*Ústav chemie a biochemie, a* <sup>e</sup>*Ústav výživy zvířat a pícninářství, AF MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno*  
kizek@sci.muni.cz

O biologickém působení flavonoidů na živočichy je známo málo. Flavonoidy jsou nízkomolekulární heterocyklické sloučeniny a jsou klasifikovány jako sekundární rostlinné metabolity všudypřítomné v rostlinné říši. Podle jejich struktury je dělíme na flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, anthokyany, isoflavony, dihydroxyflavonoly a chalkony. V našem experimentu jsme vybrali některé flavonoidy jako potencionální induktory cytochromů P450 u samců laboratorních potkanů<sup>1-3</sup>. Studie byla zaměřena na indukci CYP1A1, hlavního cytochromu P450, který se účastní aktivace některých karcinogenů. Pomocí techniky Western blotting jsme zjistili, že některé flavonoidy, například syntetický  $\beta$ -naftoflavon nebo přírodní flavonoidy jako chrysin či diosmin, účinně stimulují expresi CYP1A1 ve střevní i jaterní tkáni. Jiné testované flavonoidy, například hesperetin, hesperidin a naringin neindukují expresi CYP1A1 ve střevech a játrech potkanů. Poté, co jsme vyzkoušeli některé flavonoidy jako potencionální induktory cytochromu P450, jsme navrhli vhodné elektrochemické stanovení vybraných flavonoidů (quercetin, quercitrin, rutin, chrysin, diosmin) v tělních tekutinách. Jako stacionární techniku pro toto stanovení jsme vybrali metodu square wave voltametrie za použití uhlíkové pastové elektrody a provedli její optimalizaci, při které jsme sledovali základní elektroanalytické chování jednotlivých flavonoidů. Na základě takto získaných výsledků jsme pro vlastní stanovení zvolili následující podmínky: frekvence 180 Hz, potenciálový krok 1,95 mV a fosfátový pufr o pH 7,0. Limit detekce (3 S/N) se pro flavonoidy pohyboval od jednotek po desítky nM, vyjma diosminu, u kterého se limit detekce

nacházel v řádu jednotek  $\mu\text{M}$  koncentrace. Optimalizovanou metodu jsme použili pro stanovení flavonoidů v lidské moči. Zjistili jsme, že lidská moč významně neovlivňuje signál flavonoidů (návratnost signálů přesáhla 90 %) a můžeme je tedy bezpečně stanovit i v přítomnosti lidské moči. V návaznosti na získané výsledky jsme se poté pokusili navrhnout i senzor pro analýzu některých flavonoidů v lidské moči. Získané experimentální výsledky byly také využity pro analýzu flavonoidů v játrech potkanů krmených quercetinem pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

*Práce na tomto projektu byla podporována granty: Liga proti rakovině Praha 2006 a RASO 2007.*

#### LITERATURA

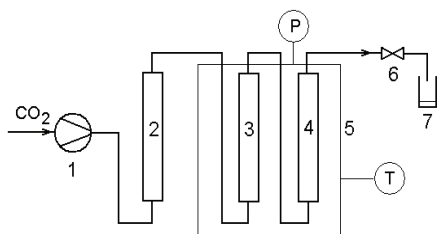
1. Klejdus B., Mikelová R., Petřelová J., Potešil D., Adam V., Stiborová M., Hodek P., Vacek J., Kizek R., Kuban V.: *J. Chromatogr. A* 1084, 71 (2005).
2. Klejdus B., Mikelová R., Petřelová J., Potešil D., Adam V., Stiborová M., Hodek P., Vacek J., Kizek R., Kuban V.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 5848 (2005).
3. Klejdus B., Vacek J., Adam V., Zehnalek J., Kizek R., Trnková L., Kuban V.: *J. Chromatogr. B* 806, 101 (2004).

#### VYUŽITÍ LIPAS Z *Geotrichum candidum* 4013 PRO PŘÍPRAVU FARMACEUTICKÝ VÝZNAMNÝCH LÁTEK

**KLÁRA HLAVSOVÁ<sup>a</sup>, MARIE ZAREVÚČKA<sup>b</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup> a HELENA SOVOVÁ<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>ÚOCHB AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6; <sup>c</sup>ÚCHP AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

Kvasinka *Geotrichum candidum* 4013 produkuje lipasu vázanou na buňku a extracelulární lipasu. Byly použity pro hydrolyzu oleje ze semen černého rybízu (*Ribes nigrum*), který obsahuje vysoké procento nenasycených mastných kyselin. Hydrolyza probíhala a) za atmosférického tlaku, ve vodě při 25 °C a b) v superkritickém CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) za tlaku 15 MPa, teplotě 40 °C a průtoku CO<sub>2</sub> 0,43-0,48 g.min<sup>-1</sup> (Obr. 1).



Obr. 1: Reaktor pro enzymovou hydrolyzu oleje v SC-CO<sub>2</sub>: (1) kompresor, (2) prostor sycení vodou, (3) prostor sycení olejem, (4) reaktor obsahující enzym, (5) vodní lázeň, (6) mikrometrický ventil, (7) ampulka s reakční směsí

Enzymové reakce v SC-CO<sub>2</sub> kombinují výhody biokatalyzátorů (substrátovou specifitu za mírných reakčních podmínek) a superkritických tekutin (rychlý transport hmoty, snadné dělení reakčních produktů od rozpouštědla a ohleduplnost k životnímu prostředí).

Při hydrolyze za atmosférického tlaku a v SC-CO<sub>2</sub> byly získány frakce obsahující směsi acylglycerolů (tri-, di-, mono-), glycerolu a volných mastných kyselin. Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie. Bylo zjištěno, že se při hydrolyze přednostně uvolňují nejen nasycené mastné kyseliny, u kterých to lze při použití 1,3-specifického enzymu očekávat, protože jsou v triacylglycerolech rostlinných olejů umístěny převážně v pozicích *sn1* a *sn3*, ale také olejová a linolová kyselina. V menším měřítku byla odštěpována také  $\alpha$ -linolenová kyselina. Po porovnání výsledků bylo zjištěno, že vyšších výtěžků bylo dosaženo při reakci v SC-CO<sub>2</sub> oproti hydrolyze za atmosférického tlaku. Díky odštěpení nasycených mastných kyselin a olejové kyseliny došlo k obohacení frakcí acylglycerolů o nenasycené mastné kyseliny, které v molekule obsahují více dvojných vazeb. Nenasycené mastné kyseliny, zvláště obsahují-li ve své molekule více dvojných vazeb, jsou pro lidský organismus velmi důležité, a jelikož je nedokáže syntetizovat, je nutné nenasycené mastné kyseliny získávat potravou. Hydrolysa oleje využívající lipasy produkované kmenem *Geotrichum candidum* 4013 by mohla být novým a účinným způsobem přípravy potravinových doplňků, které obsahují tyto zdraví prospěšné kyseliny.

*Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/04/120).*

#### FREKVENCE VYBRANÝCH GENOVÝCH POLYMORFISMŮ ASOCIOVANÝCH SE ZÁNĚTLIVÝM STŘEVNÍM ONEMOCNĚNÍM – STUDIE PACIENTŮ Z ČR A SR

**JAN HOŠEK<sup>a</sup>, LADISLAVA BARTOŠOVÁ<sup>b\*</sup>, JANA SVOBODOVÁ<sup>b</sup>, ELIŠKA VECHETOVÁ<sup>b</sup>, MICHAL KOLORZ<sup>b</sup>, PETER LOUČKA<sup>b</sup>, a MILAN BARTOŠ<sup>a</sup>**

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

Zánětlivé střevní onemocnění (IBD) je nemoc charakterizovaná chronickým zánětem gastrointestinálního traktu. Rozlišují se dva klinické subtypy, Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC), které se od sebe odlišují na základě rozdílných klinicko-patologických znaků<sup>1,2</sup>. Kumulace onemocnění v rodinách, konkordance mezi monozygotickými dvojčaty či etnické rozdílnosti podávají důkaz o vlivu genetických faktorů na vznik tohoto onemocnění<sup>1</sup>.

V České republice je prevalence CD 18-22 případů a UC 40-45 případů na 100 000 obyvatel<sup>3</sup>. Doposud však chyběla data o četnostech mutací v IBD-susceptibilních genech. Proto jsme se zaměřili na určení četností mutací u

genů, které jsou v literatuře zmiňovány nejčastěji. Jedná se o tři mutace v genu NOD2 (R702W, G908R a 1007fs), mutaci K469E v genu ICAM-1 a deleční mutaci CCR5Δ32 v genu CCR5.

Do studie bylo zahrnuto 47 pacientů s CD, 12 s UC a 63 zdravých dobrovolníků. DNA byla izolována z periferní krve vyšetřovaných jedinců. Požadovaný úsek DNA, na němž se vyskytoval hledaný polymorfismus, byl amplifikován pomocí polymerasové řetězové reakce. Získané amplicony byly štěpeny restriktivními endonukleasami, které jsou pro jednotlivé polymorfismy specifické. Produkty štěpení byly elektroforeticky rozděleny na agarosovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem. Asociace přítomnosti mutantní alely s CD nebo UC byla statisticky vyhodnocena  $\chi^2$  –testem pomocí kontingenčních tabulek.

Z našich výsledků vyplývá, že mezi skupinou zdravých dobrovolníků a skupinou pacientů s UC není žádný signifikantní rozdíl v přítomnosti sledovaných mutací genu NOD2. I přes malý počet pacientů s UC se toto zjištění shoduje s výsledky rozsáhlé evropské studie<sup>5</sup>. Naopak byla prokázána vazba mezi CD a polymorfismem 1007fs v genu NOD2. Tato mutace má i podle předešlých studií<sup>5,6</sup> nejvýraznější korelaci k onemocnění. U mutace K469E v genu ICAM-1 jsme prokázali asociační vazbu jak s CD, tak i s UC. Deleční mutace CCR5Δ32 vykazuje srovnatelnou frekvenci u všech tří srovnávaných skupin, což odpovídá dřívějším pozorováním jiných autorů<sup>4</sup>. Důležitým poznatkem naší studie bylo zjištění, že u pacientů s CD signifikantně vzrůstá počet zmutovaných genů a tím i počet mutací, které nesou. To podporuje tvrzení, že se v případě IBD jedná o polygenní dědičnost<sup>1</sup>.

Naše práce doplňuje celoevropské studie hledající kandidátní geny IBD. Na podkladě těchto skutečností bude jednou možné navrhnout genetické testy jako doplňující diagnózu ve sporných případech IBD.

*Práce byla vypracována za finanční podpory grantů IGA VFU č. 28/2006/FaF a IGA MZ č. NR9342-3/2007.*

#### LITERATURA

- Podolsky D. K.: N. Engl. J. Med. 347, 417 (2002).
- Mathew C. G., Lewis C. M.: Hum. Mol. Genet. 13, R161 (2004).
- Lukáš M., v knize: *Lékařské repetitorium* (Houdek L., ed.), s. 294-296, Galén, Praha 2003.
- Herfarth H., Polok-Kopp B., Göke M., Press A., Oppermann M.: Immunol. Lett. 77, 113 (2001).
- Lesage S., Zouali H., Cézard J.-P. and the EPWG-IBD group, Colombel J.-F. and the EPIMAD group, Belaiche J. and the GETAID group, Almer S., Tysk C., O'Morain C., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Modigliani R., Gower-Rousseau C., Macry J., Merlin F., Chamillard M., Jannot A.-S., Thomas G., Hugot J.-P.: Am. J. Hum. Genet. 70, 845 (2002).
- Özen S. C., Dağlı Ü., Kiliç M. Y., Törtüner M., Çelik Y., Özkan M., Soykan I., Çetinkaya H., Ülker A., Özden A., Bozdayi A. M.: J. Gastroenterol. 41, 304 (2006).

#### STUDIUM HOMEBOXOVÝCH GENŮ SLADKOVODNÍ MEDÚZY *Craspedacusta sowerbyi*

**MILUŠE HROUDOVÁ<sup>a,b</sup>, ZDENĚK KREJČÍK<sup>b</sup>,  
HYNEK STRNAD<sup>b</sup>, ČESTMÍR VLČEK<sup>b</sup> a VÁCLAV  
PAČES<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav molekulární genetiky AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4  
hroudovm@vscht.cz

Sladkovodní medúza *Craspedacusta sowerbyi* je zástupcem živočišného kmene žahavci (Cnidaria), 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 vyšších obratlovců, včetně člověka, než je tomu u některých evolučně vyšších živočichů (*Drosophila melanogaster*, *Ceanorhabditis elegans*).

Významnou skupinou genů regulujících ontogenezi jsou homeoboxové geny kódující transkripční faktory. Jejich struktura je silně konzervována v genomech všech živočichů a některých rostlin. V raných stádiích vývoje žahavce se podílejí na formování důležitých morfologických znaků, jako je například tělesná symetrie, dále na vývoji nervové soustavy a smyslových orgánů. Jsou součástí významných signálních drah.

V rámci tohoto projektu byly v genomech dvou žahavců (*Hydra magnipapillata* a *Nematostella vectensis*) identifikovány homeoboxové geny pomocí počítačové HMM analýzy („Hidden Markov Model“). Jednotlivé geny byly zařazeny do rodin. Pro další studium u *Craspedacusta sowerbyi* byly vybrány některé méně časté rodiny (POU, DLX, LIM). Na jejich homeodomény a specifické domény byly navrženy degenerované primery. Metodou PCR bylo získáno několik genových fragmentů. Sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že se jedná o fragmenty 3 genů patřících do rodiny POU.

Tato práce bude dále pokračovat prodloužením těchto fragmentů na celé geny metodou RACE a sledováním transkripce jednotlivých získaných genů pomocí *in situ* hybridizace v různých tkáních dospělých jedinců a některých vývojových stádií. V současné době je konstruována fosmidová knihovna genomových fragmentů (30–45 kb), která bude mimojiné použita pro analýzu okolí studovaných homeoboxových genů. Naše laboratoř provádí částečnou analýzu genomu *Craspedacusta sowerbyi* za použití výše zmíněných fosmidových klonů pomocí sekvenačního systému GS20. V blízké budoucnosti se zaměříme také na studium celkového genového repertoáru tohoto a některých dalších žahavců sekvenační analýzou cDNA.

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

## STANOVENÍ A VÝZNAM METHYLACE PROMOTORU E6 GENU LIDSKÉHO PAPILOMAVIRU 16 V INTRAEPITELIÁLNÍCH LÉZÍCH A KARCINOMECH DĚLOŽNÍHO ČÍPKU

**PAVLA HUBLAROVÁ<sup>a</sup>, PAVLA ROTTEROVÁ<sup>b</sup>, LEOPOLD ROTTER<sup>c</sup>, ZDENA HORTÍKOVÁ<sup>d</sup>, VINAY BADAL<sup>e</sup>, RUDOLF NENUTIL<sup>a</sup> a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Odd. onkol. a exper. patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, <sup>b</sup>1. Patologicko – anatomický ústav, FN u sv. Anny Brno, Pekařská 53, 656 91 Brno, <sup>c</sup>Gynekologicko – porodnická klinika FN Brno, Obilní trh 11, 602 00 Brno, <sup>d</sup>Sanatorium Helios, Štefánikova 12/16, 602 00 Brno, <sup>e</sup>Inst. Mol. Cell Biol., 61 Biopolis Drive, Proteos, Singapore, 138673, Malaysia  
hublarova@mou.cz

Lidské papillomaviry (HPV) jsou malé nebalené dsDNA viry s kružnicovým genomem. Vysoce rizikové kmeny HPV často infikují sliznici děložního čípku u žen a jsou prokazatelně příčinou vzniku intraepiteliálních lézí (CIN) a karcinomu děložního čípku. Mezi nejrizikovější kmeny patří HPV 16 a 18. Proteiny rané fáze exprese E6 a E7 jsou v kooperaci schopné transformovat buňky infikovaného epitelu funkčním vyřazením dvou nejdůležitějších antionkogenů – p53 a pRb. E6 v součinnosti s ubikvitin ligasou hostitelské buňky označí p53 pro degradaci, zatímco E7 umožní fosforylaci pRb, a uvolní tak z vazby transkripční faktor E2F, který spouští v buňkách expresi proteinů zodpovědných za přechod do S fáze. Vzhledem k vysokému počtu infikovaných žen a relativně nízkému počtu karcinomů děložního čípku, se předpokládá existence epigenetického mechanismu kontroly vývoje CIN a karcinomu. Přítomnost methylací CpG ostrůvků v promotoru genu pro E6 a E7 protein jsou součástí regulace životního cyklu HPV, stejně jako přirozené obrany buněk proti cizorodé DNA.

V naší práci nejprve detekujeme přítomnost HPV 16 a 18 pomocí PCR s nově navrženými, vysoce specifickými primery, jako kontroly používáme nádorové cervikální linie SiHa (HPV16 pozitivní), HeLa (HPV18 pozitivní) a HT3 (HPV negativní). U HPV 16 pozitivních vzorků provádíme stanovení methylace v promotoru genu E6 pomocí specifické endonukleasy McrBc. Pozitivní kontrolou je nádorová cervikální buněčná linie CaSki s několika sty methylovaných kopií genu HPV 16, negativní kontrolou je linie SiHa s jednou aktivní kopií genu HPV16.

Cílem našeho projektu je stanovit frekvenci výskytu HPV 16 a 18 nejen u pacientek s CIN a karcinomem děložního čípku ale i u náhodně vybraného vzorku populace asymptomatických žen. U HPV16 pozitivních vzorků je průběžně prokazována methylace virového genomu.

Celkem bylo analyzováno 93 kartáčkových stěrů od zdravých žen, kde se pozitivita HPV 16 pohybovala okolo 70 %, což představuje ve srovnání s odbornou literaturou výrazně vyšší procento. Tento výsledek potvrzuje vysokou citlivost nově zavedeného systému detekce, který je zároveň i vysoce specifický. U skupin pacientek s patologickými

stupni CIN je incidence HPV 16 u CIN I 80 % (n=5); u CIN II 83 % (n=6) a u CIN III 93 % (n=90). U karcinomů děložního čípku byla přítomnost HPV 16 prokázána v 55 % případů (n=35). Celková incidence HPV 16 a 18 je u CIN III a karcinomů okolo 95 %, což se shoduje s daty uváděnými v literatuře. Na stanovení methylací genomu HPV 16 se v současné době intenzivně pracuje, a proto zatím nelze vyvodit jednoznačné závěry. Očekáváme, že po vyhodnocení methylací bude možné vyjádřit individuální riziko pro ženy infikované HPV16 a rovněž bude možné prosadit tuto metodu mezi základní diagnostiku CIN.

Tato práce je podporována granty VZ MOÚ MZO 00209805 a Centrum MŠMT LC06035.

## TRANSFORMACE ROSTLIN *Nicotiana tabacum* BAKTERIÁLNÍM GENEM *bphC* PRO DIHYDROXYBIFENYLDIOXYGENASU

**ZUZANA CHRASTILOVÁ<sup>a</sup>, MARTINA NOVÁKOVÁ<sup>a,b</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a,b</sup>, TOMÁŠ MACEK<sup>b,a</sup> a MIKLÓS SZEKERES<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochem. mikrobiol., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>ÚOCHB AV ČR, Odd. přírodních látek, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>c</sup>Institute of Plant Biology, Biol. Res. Ctr. Hungarian Acad. Sci., P.O.Box 521 H-6701, Szeged, Hungary  
chrastiz@vscht.cz

Globální industrializace zapříčinila únik velkého množství toxických látek do životního prostředí. Mezi tyto toxické látky patří také polychlorované bifenylly (PCB), zvláště díky jejich perzistentnosti v životním prostředí a možnosti jejich úniku do potravního řetězce. Jednou z možností dekontaminace znečištěných ploch je využití biologických systémů, které jsou veřejností akceptovány a jsou šetrné k životnímu prostředí. Existuje mnoho způsobů, jak zvýšit účinnost odstraňování xenobiotik, jedním z nich je např. využití geneticky modifikovaných organismů.

Cílem této práce je zvýšit schopnost rostlin degradovat PCB vnesením vhodného genu do rostlinného genomu, a tím zvýšit účinnost degradace PCB v rostlinách. Pro tento účel byl vybrán bakteriální gen *bphC* z degradační dráhy polychlorovaných bifenylů bakterie *Comamonas testosteroni* B356. Produkt genu *bphC* (enzym 2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasa) štěpí bifenylový kruh, zjednodušuje strukturu a umožňuje další metabolisaci v rostlinách. V minulosti již byly připraveny rostlinné konstrukty obsahující gen *bphC* ve fúzi s detekčním markerem GUS (gen pro β-glukuronidasu), LUC (gen pro luciferasu) a s histidinovou kotvou a ve všech případech byl použit promotor kvěťákové mozaiky CaMV 35S. Připravené plasmidy byly vneseny do bakterie *Agrobacterium* GV3101 (pPM90RK), pomocí které byly rostliny *Nicotiana tabacum* transformovány. Nejdříve byla ověřena účinná exprese fúsních genů *bphC*/GUS, *bphC*/LUC a *bphC*/His v rostlinných buňkách metodou agrobakteriální infiltrace - transienční exprese. Poté následovala trvalá transformace rostlin za použití agrobakterií. Bylo připraveno



12 linií transgenních rostlin: 3 linie s geny *bphC*/GUS, 5 linií s geny *bphC*/LUC a 4 linie s genem *bphC*/His. Přítomnost transgenů byla detekována na úrovni DNA i mRNA metodou PCR, popř. RT-PCR. Expres genů *bphC*/GUS v liniích G1, G2, G3 a genů *bphC*/LUC v liniích L1, L2, L3, L4, L5 byla prokázána histochemicky. Z linií H1, H2, H3, H4 (obsahujících gen *bphC*/His) byl izolován enzym BphC. Ten byl dále identifikován za použití metody Western blot s následující imunochemickou detekcí. Enzymatická aktivita enzymu BphC produkovaného transgenními rostlinami bude v budoucnu stanovena.

Práce byla sponzorována grantem MŠMT Centrum IM06030.

### VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ ADUKTŮ STYREN OXIDU V LIDSKÉM GLOBINU

**MICHAL JÁGR, JAROSLAV MRÁZ a VLADIMÍR STRÁNSKÝ**

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10  
michaljagr@centrum.cz

Cílem této práce je vývoj citlivé analytické metody vhodné ke stanovení aduktů styren 7,8-oxidu (SO) s aminokyselinami v lidském globinu. SO vzniká v organismu metabolickou aktivací styrenu pomocí cytochrom P450 dependentního-monoxygenasového systému. SO má genotoxické a mutagení účinky<sup>1</sup>.

Biologické monitorování expozice člověka styrenu a SO, které jsou významnými surovinami v průmyslu plastických hmot, je v současné době založeno zejména na stanovení metabolitů kyseliny mandlové a fenylglyoxylové v moči<sup>2</sup>. Jinou perspektivní možností je využití tvorby aduktů SO s některými nukleofilními aminokyselinami přítomnými v globinu. V minulosti jsme provedli GC/MS a LC/MS analýzu pronasového hydrolyzátu globinu inkubovaného se SO *in vitro*, kde jsme detekovali kvantitativně nejvýznamnější adukty SO s cysteinem (SO-Cys), histidinem (SO-His) a lysinem (SO-Lys). Identitu těchto sloučenin jsme potvrdili pomocí předem syntetizovaných standardů<sup>3</sup>. V globinu lidí exponovaných *in vivo* styrenu a SO je ovšem obecně velmi nízká hladina aduktů SO (např. pro adukty SO s *N*-koncovým valinem u myši exponovaných i.p. styrenu byly publikovány hodnoty na úrovni 15-305 pmol.g<sup>-1</sup> globinu)<sup>4</sup>. Proto bylo nutné vyvinout dostatečně citlivou analytickou metodu schopnou stanovení podobně nízkých hladin i u aduktů SO-Cys, SO-His a SO-Lys. V projektu je diskutováno využití metody extrakce na tuhé fázi (SPE) za účelem obohacení hydrolyzátu globinu o adukty spolu se současným zbavením se většiny ostatních aminokyselin. Metoda SPE byla založena na rozdílné hydrofilitě SO-Cys, SO-His a SO-Lys aduktů ve srovnání s ostatními aminokyselinami. SPE kolonka Strata-X vykázala ve srovnání s kolonkami jiných výrobců a stacionárních fází nejlepší schopnosti v retenci těchto aduktů. Přitom většina ostatních aminokyselin, vyjma fenylalaninu a tryptofanu nebyla na kolonkách zadržována.

Bylo nutno i optimalizovat metodu derivatizace aduktů pro jejich GC a GC/MS analýzu. Adukty byly silylovány za produkce trimethylsilyl (TMS) či tert-butyldimethylsilyl derivátů (TBDMS) a nebo byly acylovány chlormravenčany. TBDMS silylace (na rozdíl od TMS) poskytovala s dobrou reprodukovatelností pro každý adukt jediný, dostatečně stabilní derivát. Zato po derivatizaci aduktů chlormravenčany nedošlo k detekci předpokládaných derivátů. Proto byla nadále používána derivatizace za vzniku TBDMS derivátů.

Tato práce byla podporována interním projektem SZÚ na podporu mladých vědců č.4901-54.

### LITERATURA

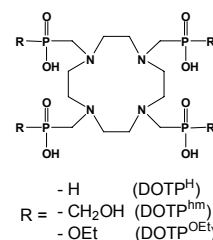
1. Linhart I.: Drug Metab. Rev. 33, 353 (2001).
2. Manini P., De Palma G., Andreoli R., Goldoni M., Mutti A.: Int. Arch. Occup. Environ. Health. 77, 433 (2004).
3. Jäger M., Mráz J., Ctibor K., Stránský V., Pospíšil M.: Biomed. Papers. 149, 82 (2005).
4. Pauwels W., Vodička P., Severi M., Plná K., Veulemans H., Hemminki K.: Carcinogenesis 17, 2673 (1996).

### TETRAFOSFOROVÁ ANALOGA LN-DOTA: KOMPLEXY BEZ VODY VE VNITŘNÍ KOORDINAČNÍ SFÉRE

**ZUZANA JANDUROVÁ**

Katedra anorganické chemie, PŘF UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha  
jandurov@natur.cuni.cz

Výjimečnost MRI („Magnetic Resonance Imaging“), klinického nástroje pro diagnostiku například nádorů, podněcuje vývoj stále lepších CA („Contrast Agents“) zvyšujících kvalitu snímků<sup>1</sup>. Kritickou vlastností CA je přítom účinnost přenosu magnetické informace z Gd<sup>3+</sup> iontu látky k molekulám vody v jejím okolí. Koordinace vody přímo k Gd<sup>3+</sup> iontu není nezbytná, pokud je druhá hydratační sféra komplexu, tvořená molekulami vody vázanými vodíkovými můstky k ligandu, dostatečně rozvinuta a může tak docházet k přenosu i prostřednictvím sféry této. Za účelem detailního prozkoumání vlivu pouze druhé hydratační sféry byly syntetizovány tři tetrafosforová analoga ligandu DOTA (DOTP<sup>H</sup>, DOTP<sup>hm</sup>, DOTP<sup>OEt</sup>) s různě hydrofilními rameny, která jsou zároveň natolik objemná, že již neumožňují koordinaci vody přímo ke Gd<sup>3+</sup> iontu.



Ligandy a jejich komplexy byly charakterizovány potenciometricky a RTG analýzou, která, stejně jako luminiscenční měření, potvrdila absenci přímo koordinované vody. Studium struktury Ln<sup>3+</sup> komplexů v roztoku odhalilo odlišnost komplexů Ln-DOTP<sup>H</sup> a Ln-DOTP<sup>OEt</sup> (směs izomerů) od komplexu třetího, Ln-DOTP<sup>hm</sup> (majoritní symetrický izomer RRRR), což může být způsobeno vodíkovými vazbami mezi rameny komplexu s hydroxomethyl-ovými skupinami. Analýza <sup>17</sup>O LIS („Lanthanide Induced Shifts“) také poukazuje na odlišnou polohu molekul vody druhé sféry u komplexů Ln-DOTP<sup>hm</sup>. Relaxometrickou studií byl nakonec prokázán nezanedbatelný vliv druhé sféry studovaných komplexů na parametry určující relaxivitu, přičemž počet molekul vody ve druhé hydratační sféře koreloval s hydrofilicitou ligandů.

*Studie byla podporována GA ČR (No. 203/03/0168) a projekty COST D38 a DiMI.*

#### LITERATURA

1. Merbach A. E., Tóth É.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. John Wiley & Sons, New York (2001).

#### VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH BIOAFINITNÍCH MIKROREAKTORŮ PRO IZOLACI IMUNOGLOBULINU E Z LIDSKÉHO SÉRA

**BARBORA JANKOVIČOVÁ<sup>a</sup>, ŠÁRKA RÖSNEROVÁ<sup>b</sup>,  
LUCIE FOJTÍKOVÁ<sup>b</sup>, JOSEF KRÁLOVSKÝ<sup>b</sup> a  
ZUZANA BÍLKOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Katedra biologických a biochemických věd a* <sup>b</sup>*Katedra analytické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice  
Barbora.Jankovicova@upce.cz*

Magnetické bioafinitní mikroreaktory jsou systémy, které splňují požadavky kladené na metody pro izolaci a detekci diagnosticky významných látek v komplexním biologickém materiálu. Vysoká selektivita a specifita metody je zde zajištěna tvorbou biospecifického páru vázaného ligandu s izolovanou látkou. Magneticky aktivní pevná fáze přináší snadnou manipulaci a miniaturizaci celého systému.

Protilátky třídy IgE (tj. imunoglobulin E) mají značný klinický význam. Zvýšené hladiny specifických IgE protilátek jsou hlavní příčinou alergických reakcí, které se pro svůj rostoucí trend v populaci stávají závažným medicínským problémem. Koncentrace IgE ve fyziologickém lidském séru je v porovnání s ostatními sérovými proteiny velmi nízká (do 200 IU/ml). Cílem této práce je vyvinout rychlou a účinnou metodu izolace protilátek třídy IgE ze sér senzibilizovaných pacientů. Tyto protilátky budou použity k přípravě specifického imunosorbentu pro vyhledávání klinicky významných tzv. alergogenních epitopů komplexního alergenu. Příprava vakcín pro specifickou imunoterapii obsahujících pouze epitopy s alergogenním

potenciálem může významně snížit rizikost hyposenzibilizační léčby a tedy i zátěž pro pacienta.

Výběr metod pro účinnou izolaci IgE molekul byl volen podle nároků na čistotu a výtěžnost metody. K izolaci IgE ze sér senzibilizovaných pacientů byla použita metoda frakcionované precipitace, technika chromatografie na měničích iontů a metoda bioafinitní chromatografie a to buď pomocí lektinu Concanavalinu A nebo pomocí specifických anti-IgE protilátek. K přípravě specifických bioafinitních nosičů byly použity magnetické mikročástice SiMAG-active (Chemicell, Německo) a Estapor (Merck, Německo), podmínky vazby byly optimalizovány. Frakce IgE získané různými metodami, příp. jejich kombinací, byly porovnány, čistota a množství izolovaného IgE byly ověřovány technikami SDS-PAGE a ELISA.

*Tato práce byla podpořena fondem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM 0021627502) a Grantovou agenturou ČR (grant GA ČR č. 203/05/0241).*

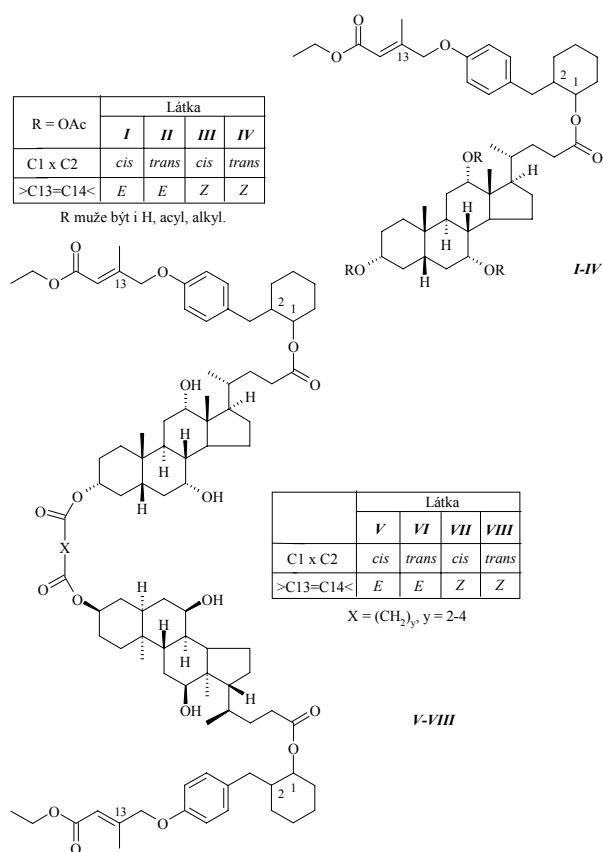
#### STEROIDNÍ SLOUČENINY JAKO NOSIČE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

**ONDŘEJ JURČEK<sup>a,b</sup>, ZDENĚK WIMMER<sup>b</sup>  
a PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT, Technická 5, 160 28 Praha 6;* <sup>b</sup>*ÚEB AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4  
ondrej.jurcek@vscht.cz*

Steroidní látky jsou běžně přítomny v tělech rostlin a živočichů. Jejich získávání je založeno především na izolaci z těchto přirozených přírodních zdrojů. Ekologickým a účinným způsobem jejich získávání je extrakce pomocí rozpouštědel za superkritických podmínek (např. CO<sub>2</sub> za superkritických podmínek), která je prováděna v naší laboratoři. Separované steroidní sloučeniny (fytosteroly a fytoekdysteroidy) mohou být dále používány pro syntézy supramolekulárních struktur. Naším hlavním cílem je syntetizovat takové steroidní sloučeniny, složené z jedné či více steroidních jednotek, které by byly schopny úspěšně vnést a postupně a pomalu uvolňovat biologicky aktivní látky v organismu.

Současným modelem je pro nás aplikace juvenoidů (bioanalogů juvenilních hormonů – biologicky aktivních a účinných látek vhodných k regulaci početnosti populací hmyzích škůdců) do těla vybraných škodlivých druhů hmyzu<sup>1,2</sup>. Interakce mezi biologicky aktivní látkou a steroidní sloučeninou může být zajištěna jak vazebně, tak ne vazebně. Bylo připraveno několik prekursorů supramolekulárních struktur I-IV a několik steroidních sloučenin V-VIII s nejlépe výstižným anglickým označením *cleft type*, kde k interakci s juvenoidem dochází prostřednictvím esterové vazby. Sloučeniny byly poskytnuty pro biologické testování.



Za finanční podporu projektu 2B06024 (SUPRAFYT) a projektu MSM6046137305 děkujeme MŠMT ČR.

#### LITERATURA

- Wimmer Z., Rejzek M., Zarevúcka M., Kuldová J., Hrdý I., Němec V., Romaňuk M.: J. Chem. Ecol. 23, 605 (1997).
- Wimmer Z., Kuldová J., Hrdý I., Bennettová B.: Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 442 (2006).

#### FARMAKOGNOSTICKÁ STUDIE TAXONU *Helianthus annuus* L.

JANA KARLÍČKOVÁ<sup>a</sup>, ZUZANA ŘEHÁKOVÁ<sup>a</sup>,  
KATEŘINA KUBÍKOVÁ<sup>a</sup>, LUDEK JAHODÁŘ<sup>a</sup> a  
VLADIMÍR BUCHTA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, <sup>b</sup>Katedra biologických a lékařských věd, FarmF, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
jana.karlickova@faf.cuni.cz

Při prováděném screeningu antifungální aktivity 50 druhů čeledi Asteraceae vykázal taxon *Helianthus annuus* L. v tomto *in vitro* testu signifikantní aktivitu<sup>1</sup>. Na základě

pozitivního výsledku byla provedena analýza rostlinného materiálu a pilotní studie biologické aktivity.

Byla provedena macerace sušených listů vodou, následovalo vytřepání dichlormethanem, chloroformem a butanolem<sup>2</sup>. Další část listové drogy byla sonikována 80% ethanolom. Byl proveden test na akutní toxicitu (Tubifex tubifex test), který využívá kroužkovce (nitěnky) a slouží nám jako doprovodný test pro zachycení zajímavého extraktu (bioassay-guided separace). Akutní toxicita byla stanovena u butanolového podílu (EC<sub>50</sub>=0,0131 g/ml) a vodného podílu (EC<sub>50</sub>=0,0724 g/ml). Protože butanolový podíl vykázal v tomto testu aktivitu, byl dále dělen na sloupci silikagelu, vzniklo 34 frakcí, které byly postupně spojovány na základě vyhodnocení výsledků tenkovrstvé chromatografie. Vzniklé spojené frakce (pojmenované HEA) byly testovány pomocí DPPH testu na antiradikálovou aktivitu. Pozitivní výsledek DPPH testu byl získán u těchto frakcí HEA: HEA 6-8 (EC<sub>50</sub>=0,213 mg/ml), HEA 25-28 (EC<sub>50</sub>=0,132 mg/ml), HEA 29 (EC<sub>50</sub>=0,353 mg/ml), HEA 30 (EC<sub>50</sub>=0,153 mg/ml). U těchto frakcí s pozitivním výsledkem v DPPH testu byla použita i jiná metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) pro stanovení antiradikálové aktivity. Pouze frakce 6-8 vykázala po 4 min 7x nižší aktivitu než standard Trolox v tomto *in vitro* testu.

Dále byl zpracováván i chloroformový podíl, byl dělen na Sephadexovém sloupci a získány 3 frakce (frakce 1, frakce 2, frakce 3). Všechny frakce byly podrobeny DPPH testu a pozitivní svým výsledkem byla frakce 2 (EC<sub>50</sub>=0,41mg/ml) a frakce 3 (EC<sub>50</sub>=0,118mg/ml), u nich byla provedena i metoda FRAP – pouze u frakce 3 byla naměřena aktivita po 4 min 6x nižší než u standardu<sup>3</sup>.

Antifungální aktivita byla provedena u ethanolového extraktu, dichlormethanového a butanolového podílu, frakcí HEA 20-21, HEA 20-24, HEA 29 pomocí Mikrodituční bujónové metody v destičkách na 8 kmenech (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigellii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*). U ethanolového extraktu byla aktivita prokázána u všech testovaných kmenů hub, u butanolového podílu pouze u *Trichophyton mentagrophytes*. Ethanolový extrakt bude dále zpracováván a testován na antiradikálovou a fototoxickou aktivitu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GAUK 118/2006/B BIO.

#### LITERATURA

- Jahodar L., Buchta V., Ryglova H., Jun D., Opletal L.: 3<sup>rd</sup> International Symposium of Natural Drugs Proceedings (Borrelli F, ed.), Naples, 2-4 October 2003, str. 249 (Plenary Lecture).
- Macías, A.F., Molinillo, J.M.G., Torres, A.: Phytochemistry 45, 683 (1997).
- Řeháková Z., Karlíčková J., Jahodář L., Kubíková K., Brojerová E., Kolečkář V., Opletal L.: Book of Abstracts Joint Meeting 2006, October 4-7, Marburg (bez editora), str. 107.

## AUTOKRINNÝ A PARAKRINNÝ MECHANISMUS ÚČINKU VEGF U ASTROGLIÁLNYCH NÁDOROV

**PETRA KNÍŽETOVÁ<sup>a</sup>, ALICE HLOBILKOVÁ,  
MONIKA LEVKOVÁ a ZDENĚK KOLÁŘ**

Ústav patológie, Lekárska fakulta, Univerzita Palackého,  
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc  
knizetko@yahoo.com

Angiogenéza je dôležitým procesom v progresii nádoru. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) je multifunkčným cytokinóm zodpovedným za angiogenézu, vaskulárnu permeabilitu, a hyperkoagulabilitu u viacerých typov nádorov. VEGF pôsobí prostredníctvom dvoch receptorov Flt-1 a KDR (VEGFR1 a VEGFR2), exprimovaných na povrchu cievného endotelu, pričom transdukcia signálu prebieha prostredníctvom PI3K/Akt/PKB, PLC $\gamma$ /PKC a MAPK signálnych dráh. Následne po prenose signálu dochádza k proliferácii, migrácii endoteliálnych buniek, či indukcii ich permeability.

Spomedzi nádorov centrálného nervového systému sú najpočetnejšími nádory astrogliálneho pôvodu. Doba prežívania pacientov s nádormi označovanými ako „high grade“ je niekoľko mesiacov s maximom do dvoch rokov. Tieto nádory sa vyznačujú zvýšenou proliferáciou, hypervaskularizáciou, výraznou angiogenézou, a tvorbou fokálnych nekroz. Viaceré štúdie poukazujú na úlohu VEGF v patofyziológii astrogliálnych nádorov v zmysle jeho parakrinného pôsobenia na nádorové cievné elementy. Jeho zvýšená expresia signifikantne koreluje so zvýšenou progresiou nádoru. Napriek faktu, že bola dokázaná expresia VEGF receptorov aj na úrovni gliálnych elementov nádoru, neexistuje detailná štúdia zaoberajúca sa priebehom intracelulárnej signalizácie VEGF v zmysle jeho autokrinného pôsobenia.

V našej práci sme sa zaoberali účinkom VEGF na proliferáciu, motilitu a migráciu astrogliálnych nádorových línií, ako aj priebehom signálnej dráhy VEGF na intracelulárnej úrovni. Podarilo sa nám dokázať koexpresiu VEGF a VEGFR1/2 u všetkých nami testovaných astrogliálnych nádorových línií. Tento dôkaz bol nevyhnutným predpokladom pre potvrdenie autokrinného pôsobenia VEGF. MTT proliferačný test potvrdil mitogénny účinok VEGF a už po piatich minútach pôsobenia indukoval tvorbu „stress fibers“, čo jednoznačne poukazuje na zvýšenú motilitu buniek. Reorganizácia aktinového cytoskeletu prebiehala v smere migrácie buniek. Na intracelulárnej úrovni dochádzalo po aplikácii VEGF k masívnej fosforylácii ERK1/2Thr202/Tyr204. Vzhľadom na koaktiváciu signálnych dráh PI3K/Akt/PKB, Ras/c-Raf a PLC $\gamma$ /PKC u endotelu vplyvom VEGF, sme stanovili hladinu fosforylovaných foriem AktSer473, PLC $\gamma$ Tyr783. Miera fosforylácie AktSer473 a PLC $\gamma$ Tyr783 nebola signifikantne zvýšená. Súčasná aplikácia VEGF a c-Raf inhibítora (GW5074) potlačila jeho stimulačný účinok. Pri súčasnom pôsobení VEGF v kombinácii s inhibítormi PI3K (wortmannin) a inhibítormi PLC $\gamma$  (U73122), nedochádzalo k potlačeniu VEGF závislej aktivity ERK1/2Thr202/Tyr204.

Vyššie uvedené výsledky poskytujú nový náhľad na úlohu VEGF ako auto/ parakrinného regulátora progresie astrogliálnych nádorov stimuláciou proliferácie a motility nádorových buniek na strane jednej, stimuláciou nádorovej angiogenézy na strane druhej.

Táto práca bola financovaná grantom IGAMZCRNR/7828-3 a MSM6198959216.

## NEURÁLNI DIFERENCIACE EMBRYONÁLNYCH NÁDOROVÝCH BUNĚK P19 JE OVLIVNĚNA ZMĚNOU INTRACELULÁRNÍHO REDOXNÍHO STAVU

**ROMAN KONOPKA<sup>ab</sup>, JIŘÍ PACHERNIK<sup>b</sup>, ANTONÍN LOJEK<sup>a</sup> a LUKÁŠ KUBALA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno;  
<sup>b</sup>Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Pluripotenti embryonální kmenové buňky a embryonální nádorové buňky (EC) je možné *in vitro* diferenciovat do různých buněčných typů. Bezsérové prostředí indukuje v EC buňkách neurální diferenciaci, proces který je umocněn působením kyseliny retinové. Předpokládá se, že signální dráhy aktivované během neurální diferenciaci, jsou senzitivní na intracelulární redoxní stav daný rovnováhou mezi intracelulárně produkovanými reaktivními metabolity kyslíku (RMK) a hladinou intracelulárních antioxidantů. Proto byla sledována možnost ovlivnění neurální diferenciaci EC buněk *in vitro* modulací intracelulárního redoxního stavu. EC buňky P19 byly ovlivněny antioxidanty glutationem, N-acetyl cysteinem, kyselinou askorbovou a inhibitory enzymů podílejících se na intracelulární produkci RMK difenyl jodidem a apocyninem. Neurální diferenciaci byla sledována na základě změny exprese proteinů charakteristických pro pluripotenti nebo nervové buňky po dobu 1-4 dnů. Testované antioxidanty snižovaly expresi Oct-4 (znak pluripotence) a E-cadherinu (znak buněk odlišných od neurálních) a zároveň zvyšovaly expresi N-cadherinu (znak neurálních buněk) oproti neovlivněným buňkám. Vybrané antioxidanty tedy urychlovaly diferenciaci buněčné linie P19 do neurálních buněk. Naše výsledky potvrdily význam redoxního stavu buňky v regulaci buněčné diferenciaci u pluripotenti buněk P19.

## DEFENCE RESPONSE OF *Brassica napus* AGAINST PATHOGEN *Leptosphaeria maculans* - COMPATIBLE AND INCOMPATIBLE INTERACTION

**BARBORA KORBELOVÁ<sup>ab</sup>, VLADIMÍR ŠAŠEK<sup>a</sup>,  
LENKA BURKETOVÁ<sup>a</sup> and OLGA VALENTOVÁ<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Experimental Botany, AS CR, Na Karlovce 1a, 160 00 Prague 6; <sup>b</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, ICT Prague, Technická 3, 160 28 Prague 6  
korbelova@ueb.cas.cz

The subject of this research is a study of defence response of *Brassica napus* against fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* using microscopy, spectrophotometry and molecular biology methods. The fungus *Leptosphaeria maculans* (Desm.) represents the most serious disease, causing so-called “blackleg disease” of oilseed rape and canola. This threatening disease is spread worldwide, including the Czech Republic, where causes significant yield losses. Two isolates of *L. maculans* (virulent and avirulent) are used in this research.

During the defence response to the pathogen the plants produce callose which is detected by spectrofluorometry and microscopy methods using aniline blue. Callose accumulation is increased during defence response *B. napus* against *L. maculans* and differs in compatible and incompatible interaction. Reactive oxygen species, esp. hydrogen peroxide, is another of the defence response change. Determination of hydrogen peroxide is done using xylenol orange *in vitro* and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) *in situ*. Accumulation speed of hydrogen peroxide is different in using virulent and avirulent isolates in case avirulent isolate accumulation is speedier. DAB staining shows hydrogen peroxide accumulation near *L. maculans* hyphae. The antioxidant enzyme activity is measured by spectrophotometry method using product increasing or substrate decreasing. Increasing of guaiacol dependent peroxidase activity is significant using avirulent isolate *L. maculans*. The infect plants induce pathogenesis-related proteins. This induction is studied by PR genes expression using RT-PCR. The gene expression is higher in infect plant than control plant.

Acquired results purvey knowledge of defence response of *B. napus* to *L. maculans* compatible and incompatible interaction.

Supported by grants MŠMT KONTAKT CZ-4 a MŠMT IP05ME825, MŠMT MD\_45\_2, and GAČR 522/03/0353.

## ZMĚNA ENANTIOSELEKTIVITY A SUBSTRÁTOVÉ SPECIFITY HALOGENALKANDEHALOGENASY PROTEINOVÝM INŽENÝRSTVÍM

**TÁŇA KOUDELÁKOVÁ<sup>a</sup>, ZBYNĚK PROKOP<sup>a</sup>, YUKARI SATO<sup>b</sup>, MARTA MONINCOVÁ<sup>a</sup>, ANDREA JESENSKÁ<sup>a</sup>, LUCIE GRODECKÁ<sup>a</sup>, TOSHIA SENDA<sup>c</sup>, YUJI NAGATA<sup>b</sup> a JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Loschmidtovy laboratoře, Masarykova univerzita, Brno;

<sup>b</sup>Department of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japonsko; <sup>c</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokio, Japonsko  
jiri@chemi.muni.cz; <http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/>

Objev enantioselektivity u halogenalkandehalogenas (EC 3.8.1.5) umožnil využití enzymů této proteinové rodiny k výrobě některých alkoholů s vysokou optickou čistotou. Opticky čisté alkoholy mohou být využívány jako prekurzory léčiv, agrochemikálií nebo potravinářských aditiv. Opticky čisté

alkoholy lze připravit pomocí dehalogenas enantioselektivní hydrolyzou racemických směsí halogenovaných sloučenin. Jedinečná enantioselektivita vůči různým druhům substrátů byla prokázána u halogenalkandehalogenasy DbjA izolované z bakterie *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Cílem tohoto projektu bylo rozšířit enantioselektivitu DbjA na jiné enzymy z rodiny halogenalkandehalogenas metodami proteinového inženýrství. Pro úpravu místně řízenou mutagenézí byla vybrána dehalogenasa DhaA z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064, která se DbjA nejvíce strukturálně podobá.

Hlavní rozdíl mezi DhaA a DbjA spočívá v přítomnosti inserce <sub>139</sub>HHTEVAEEQDH<sub>149</sub> vložené mezi hlavní a víčkovou doménou DbjA. Kódující sekvence byla vnesena do genu *dhaA* pomocí inverzní polymerasové řetězové reakce. Dále bylo v DhaA zrekonstruováno aktivní místo DbjA kumulativní místně řízenou mutagenézí. Substitucemi v místě 8 aminokyselin (W141F, P142A, F144A, G171R, A172V, K175G, C176G a V245A) vzniklo 6 nových rekombinantních genů, které byly heterologně exprimovány v bakterii *Escherichia coli* BL21 (DE3). Čisté proteiny byly získány afinitní chromatografií. Sekundární struktura proteinů byla ověřena měřením cirkulárního dichroismu. Dehalogenasová aktivita mutantních proteinů vůči 1,3-dibrompropanu a jejich enantioselektivita se sadou β-substituovaných alifatických bromalkanů a jedním β-halogenovaným esterem byly testovány plynovou chromatografií. Finální mutantní enzym byl testován spolu s DhaA a DbjA na substrátovou specifitu se sadou 30 substrátů s cílem porozumět změnám vneseným do aktivního místa mutacemi.

Všechny proteiny byly produkovány v rozpustné formě. Měření cirkulárního dichroismu ukázalo, že dva proteiny nejsou poskládané. Toto pozorování bylo v souladu se zjištěním, že ze šesti mutantních proteinů byly jen čtyři aktivní vůči 1,3-dibrompropanu. Finální kumulativní mutant vykazoval specifickou aktivitu srovnatelnou s přirozeným enzymem DhaA. Všechny aktivní proteiny byly testovány na enantioselektivitu. Inserce unikátní sekvence spolu se změnami aktivního místa sice nevedla ke zvýšení enantioselektivity s 2-brompentanem, částečně však zvýšila enantioselektivitu s 2-bromhexanem a 2-bromheptanem a významně zlepšila enantioselektivitu vůči ethyl-2-brompropionátu (E-hodnota se zvýšila ze 72 na >200). Finální mutantní enzym též vykazoval pozměněnou substrátovou specifitu, která se lišila jak od DhaA, tak od DbjA. Finální mutantní protein byl výrazně aktivnější vůči 1,2-dibromethanu, 1-brom-2-chlorethanu a 4-brombutyronitrilu než oba výchozí enzymy.

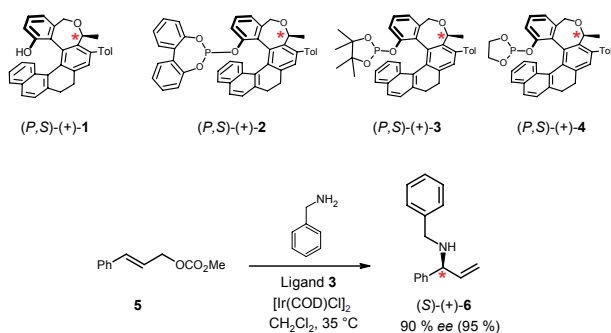
## PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ FOSFITŮ ODVOZENÝCH Z HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH LÁTEK

**ZUZANA KRAUSOVÁ<sup>a</sup>, PETR SEHNAL<sup>a</sup>, IRENA G. STARÁ<sup>a,\*</sup>, IVO STARÝ<sup>a,\*</sup>, DAVID ŠAMAN<sup>a</sup> a PETER EILBRACHT<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Organische Chemie, Fb 3, Dortmund University, Otto-Hahn-Str. 6, D-44221 Dortmund, Germany  
alex@uochb.cas.cz

Využití inherentně chirálních helicenů v asymetrické katalýze je dosud minimální, ačkoliv by robustní helikální ligandy mohly být účinnými induktory chiralit. Námi vyvinutý obecný způsob přípravy helikálně chirálních látek, který je založen na intramolekulární [2+2+2] cykloizomeraci aromatických triynů za katalýzy<sup>1</sup> kobaltem(I) či niklem(0), umožňuje připravit tyto látky v preparativním měřítku<sup>2</sup>. Takto byl připraven analog [6]helicenu **1** v opticky čisté formě.

Látky **2** až **4** byly připraveny reakcí helicenu **1** s příslušnými fosforochloriditidy v přítomnosti hydridu sodného v THF. Vzniklé fosfity byly využity jako chirální ligandy při enantioselektivní allylové aminaci. Nadějně výsledky byly dosaženy s ligandem **3**, kdy reakcí látky **5** s benzylaminem za katalýzy komplexem iridia(I) vzniká produkt **6** v 95% výtěžku a 90% enantiomerním nadbytku.



Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg. č. 203/07/1664), Ministerstvem průmyslu a obchodu/Zentiva (reg. č. FI-IM/073), a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, reg. č. LC05A57).

#### LITERATURA

- (a) Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulišek L., Fiedler P.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9175 (2002). (b) Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Vyskočil Š., Fiedler P.: *J. Org. Chem.* **68**, 5193 (2003).
- Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšínský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* **13**, 2547 (2005).

#### ENZYMOVÉ SYSTÉMY BAKTERIE *Comamonas testosteroni* PARTICIPUJÍCÍ NA PRVÉ FÁZI BIODEGRADACE FENOLU

V. KREMLÁČKOVÁ<sup>a</sup>, M. TUREK<sup>a</sup>, J. PÁČA Jr.<sup>a</sup>, J. PÁČA<sup>b</sup> a M. STIBOROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemie, PřF UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, <sup>b</sup>Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
 verukremla@centrum.cz

Bakterie *Comamonas testosteroni* je významným primárním degradérem fenolu. Je schopna využít fenolické látky jako jediný zdroj energie a uhlíku pro svůj růst. Tato schopnost biodegradace fenolických polutantů může být uplatněna při biologických dekontaminacích znečištěného životního prostředí. První a současně limitující reakcí aerobní degradace fenolu je hydroxylace na catechol. Za tento krok je zodpovědná především NADPH-dependentní fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7). Catechol je u prokaryot následně štěpen catechol-2,3-dioxygenasou (EC 1.13.11.2) na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové (META dráha), který se dále metabolizuje až na pyruvát. Tento konečný produkt buňky začleňují do svého intermediárního metabolismu. V předkládané studii dokumentujeme, že je NADPH-dependentní fenolhydroxylasa, primární enzym biodegradace fenolu, exprimována v *C. testosteroni*, konkrétně v cytoplasmě studované bakterie. Výsledky experimentů signalizují, že NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je tímto mikroorganismem exkretována do vnějšího prostředí (růstového média), ve kterém je aktivní. Výše uvedená flavinová monooxygenasa byla částečně purifikována (frakční precipitace polyethylenglykolem 6000, gelová permeační chromatografie na sloupci Sepharosy-4B) s výtěžkem 0,15 % z celkové aktivity enzymu. Získaný enzym byl charakterizován z hlediska kinetiky degradace fenolu a byla stanovena jeho molekulová hmotnost. Jedná se o protein složený ze čtyř podjednotek o celkové molekulové hmotnosti ~240 kDa. Předkládaná práce je pilotní studií, ve které byla NADPH-dependentní fenolhydroxylasa z *C. testosteroni* poprvé purifikována. Významná je též charakterizace enzymu, která přispívá k návrhu a optimalizaci biologického složení bioreaktorů používaných pro degradaci fenolů z odpadních vod.

Finančně podporováno GAČR (grant 303/05/2195 a 104/04/0686).

#### MYELOPEROXIDASA SE VÁŽE NA EXTRACELULÁRNÍ MATRIX V ZÁVISLOSTI NA GLYKOSAMINOGLYKANECH

LUKÁŠ KUBALA<sup>a</sup>, STEPHAN BALDUS<sup>b</sup>, ANTONÍN LOJEK<sup>a</sup> a JASON P. EISERICH<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; <sup>b</sup>Department of Cardiology, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany 20246; <sup>c</sup>Dept of Internal Medicine, Dept of Physiology and Membrane Biology, School of Medicine, University of California, Davis, CA USA

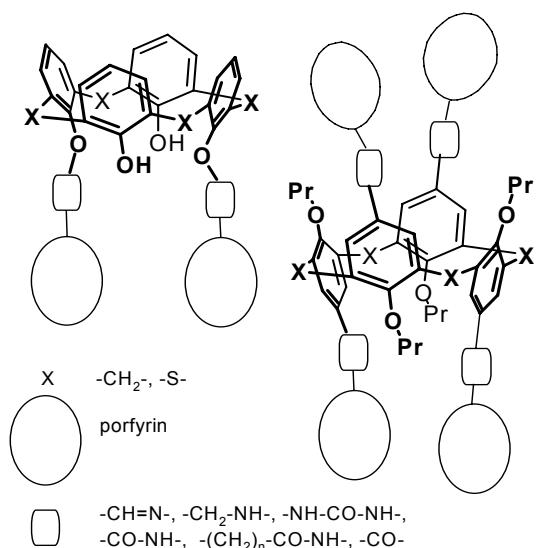
Myeloperoxidasa je enzym hojně exprimovaný v neutrofilních granulocytech hrající významnou roli v akutních a chronických zánětlivých chorobách. Během zánětlivé reakce je myeloperoxidasa uvolňována aktivovanými neutrofilními granulocyty do krve, váže se na endoteliální výstelku, prochází endotelem a je ukládána do subendoteliálního prostoru. Avšak mechanismus ukládání myeloperoxidasy a ovlivnění její enzymatické aktivity není známo. Proto byla sledována modulace vazby myeloperoxidasy na

extracelulární matrix a její komponenty. Dále byla sledována modulace enzymatické aktivity myeloperoxidasy v přítomnosti složek extracelulární matrix. Bylo prokázáno, že myeloperoxidasa se váže jak na izolovanou extracelulární matrix, tak na její složky, purifikovaný fibronektin a kolagen. Vazba myeloperoxidasy byla závislá na přítomnosti glykosaminoglykanů, testovaného heparinu a chondroitinu. Nadbytek heparinu a chondroitinu blokoval vazbu myeloperoxidasy na extracelulární matrix. Myeloperoxidasa v přítomnosti fibronektinu a kolagenu vykazovala mírně zvýšenou enzymatickou aktivitu oxidace a chlorinace modelových substrátů. Celkově získané výsledky prokázaly vazbu myeloperoxidasy na extracelulární matrix závislou na glykosaminoglykanech a enzymatickou aktivitu navázané myeloperoxidasy.

### NOVÉ (THIA)CALIXAREN-PORFYRINOVÉ RECEPTORY PRO KOMPLEXACI FULLERENŮ

**ONDŘEJ KUNDRÁT, JAN BUDKA, IVAN STIBOR a PAVEL LHOTÁK**

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



Receptory vzniklé spojením (thia)calix[4]arenu s porfyrinovými jednotkami prostřednictvím vhodného můstku, známé též jako molekulární pinzety, jsou v poslední době významnou skupinou látek schopných komplexovat fullereny C<sub>60</sub> a C<sub>70</sub>. Porfyrinová část interaguje s fullerénem, zatímco (thia)calixarenový skelet slouží jako vhodné molekulové lešení. Ukazuje se, že míru asociace lze ovlivnit různými způsoby, a to např. volbou rozpouštědla (benzen vs. toluen), nebo derivatizací porfyrinové části (elektronově bohaté vs. elektronově chudé, příp. žádné substituenty). Tvorba komplexu závisí taktéž na použitém calixarenu

(calixaren vs. thiacalixaren), na místě spojení obou jednotek (horní vs. dolní okraj calixarenu), na počtu připojených porfyrinových jednotek k (thia)calixarenu a v neposlední řadě na výběru vhodné spojky (iminová, aminová, amidová, močovinná, etherická, esterová funkce). Vhodnou kombinací jednotlivých možností bylo dosaženo i vysoké selektivity komplexace C<sub>70</sub>/C<sub>60</sub>, která bude využita pro dělení směsí fullerénů.

#### LITERATURA

1. Lhoták P.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1675.
2. Dudič M., Lhoták P., Stibor I., Petříčková H., Lang K.: New J. Chem. 28, 85 (2004).
3. Hosseini A., Taylor S., Accorsi G., Armaroli N., Reed C. A., Boyd P. D. W.: J. Am. Chem. Soc. 128, 15903 (2006).
4. Káš M., Lang K., Stibor I., Lhoták P.: Tetrahedron Lett. 48, 477 (2007).
5. Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori N., Miyano S.: Chem. Rev. 106, 5291 (2006).

### APOPTÓZA NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ V PRŮBĚHU AKUTNÍHO ZÁNĚTU

**TEREZA LANGROVÁ<sup>a,b</sup>, ZBYŠEK SLÁDEK<sup>a,b</sup> a DUŠAN RYŠÁNEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, <sup>b</sup>Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32, Brno  
xlangrov@node.mendelu.cz

Apoptóza neutrofilů a následná fagocytóza apoptotických neutrofilů makrofágy jsou důležité pro úspěšné ukončení reakcí akutního zánětu mléčné žlázy. Apoptóza je charakterizována specifickými biochemickými kroky, které ji odlišují od nekrózy. Jedním z nich je translokace fosfatidylserinu (PS) z vnitřní na vnější vrstvu cytoplazmatické membrány buňky, která podstupuje apoptózu. Detekce raného stádia apoptózy se provádí pomocí fluorescein-konjugovaného Annexinu V, který má přirozenou afinitu k PS. Váže se s translokovaným PS a tím umožňuje detekci apoptotických buněk.

Cílem této studie bylo zjistit změny v podílu apoptotických neutrofilních granulocytů v průběhu rezoluce zánětlivé reakce mléčné žlázy skotu. Zánětlivá reakce byla indukována komponenty buněčné stěny G<sup>+</sup> bakterií (muramylidipeptid-MDP) a G<sup>-</sup> bakterií (lipopolysacharid-LPS), jako inertní induktor byl použit PBS.

Průběh zánětlivé reakce po indukci byl sledován ve čtyřech časových bodech - 24 h a 48 h (iniciace zánětlivé reakce), 72 h a 168 h (rezoluce zánětlivé reakce). Průtokovou cytometrií byl zjištěn celkový počet buněk, podíl neutrofilních granulocytů (neutrofilů), podíl apoptotických a nekrotických neutrofilů. Průběh zánětlivé reakce se lišil v závislosti na použitém induktoru. Po indukci PBS bylo zjištěno výrazné zvýšení apoptotických neutrofilů během iniciace zánětlivé reakce, během rezoluce pak snižování podílu apoptotických neutrofilů. Po indukci MDP a LPS byl

průběh zánětlivé reakce charakteristický pozvolným nárůstem podílu apoptotických neutrofilů, zánětlivá reakce měla tedy delší dobu trvání.

Z výsledků studie je zřejmé, že bakteriální toxiny, MDP a LPS, výrazně prodlužují dobu trvání akutního zánětu. Zdraví mléčné žlázy závisí na rychlém odstranění apoptotických neutrofilů makrofágy a návratu postižené tkáně do původního stavu. Proto by látky modulující apoptózu neměly být opomíjeny při studiu zánětlivé reakce organismu.

*Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.*

### PREPARATION OF WELL DEFINED SILICA NANOPARTICLES AND THEIR ENCAPSULATION VIA *IN-SITU* EMULSION/MINIEMULSION POLYMERIZATION

**MARIÁN LEHOCKÝ**

*Institute of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Nad Stráněmi 4511, 760 05 Zlín  
lehocky@post.cz*

The importance and advantages of monodispersed nanometer-sized particles were shown not only in the scientific field, but also in various industrial applications, e.g. catalysts, pigments, pharmacy, etc. Of these particles, SiO<sub>2</sub> nanoparticles are used to make electronic substrates, thin film substrates, electrical insulators, thermal insulators humidity sensors, etc. The properties of amorphous silica of high specific surface area, from the smallest colloidal particles to macroscopic gels, depend largely on the chemistry of the surface of the solid phase. This is of practical importance in the technology of cracking catalysts, mineral processing, ceramics and adsorbents. It is also directly involved in the manufacture and use of siliceous fillers and thickening agents in organic systems including paints, inks, elastomers, and lubricating greases. Within the last decade, a much clearer picture of the nature of siliceous surfaces has been obtained, and new products based on chemical modifications of these surfaces have been developed. Nevertheless, the knowledge of chemical functionalities on the silica nanoparticle surfaces is still poor and has not been fully described.

The prepared/commercial silica nanoparticles were modified and encapsulated by in situ emulsion/miniemulsion polymerization of poly(styrene) in order to obtain hybrid organic/inorganic nanocomposites. The innovation of this process is made by use of SPM as a co-surfactant during the polymerization.

In this work, the chemical surface composition, wettability, porosity, and thermal properties, of silica nanoparticles were investigated prior to the preparation of the nanocomposites. The characterization during different stages of process such as nanoparticles activation, surface modification, and encapsulation with polystyrene was accessed by FT-IR spectroscopy, TEM and SEM.

### ACTIVATION OF CASPASE-12 IN LYTIC OR APOPTOTIC CELLS INFECTED BY VACCINIA VIRUS RECOMBINANTS

**JANA LIŠKOVÁ, MARTINA SPIŠÁKOVÁ, MARIE KALBÁČOVÁ, and ZORA MĚLKOVÁ**

*Institute of Immunology and Microbiology, 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic  
janefox@biolog.cz*

Vaccinia virus (VV) infection of most cell types induces a lysis of the cell that is considered equivalent to necrosis. However, we have previously observed that VV infection of two epithelial cell lines, HeLa G and BSC-40, increased activation and activity of caspases, compared to mock-infected cells. Despite of the lytic character of infection, these effects were prevented by simultaneous expression of Bcl-2 by VV. Expression of Bcl-2 decreased also cleavage of a death substrate cytokeratin-18 in HeLa G cells, while it increased its levels in BSC-40 cells as it induced their apoptosis by an unknown mechanism. We have further observed that expression of Bcl-2 by VV induced changes in levels of free calcium in cytoplasm as well as in organelles. Therefore, we have focused on activation of caspase-12 and the role of calpain during VV infection and in Bcl-2-induced apoptosis.

We infected several cell lines with recombinant vaccinia viruses expressing Bcl-2 or control genes luciferase or chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in the presence or absence of two different inhibitors of calpain (calpain inhibitor V and calpastatin peptide). Then we analyzed the samples by western blotting using antibodies against caspase-12, several death substrates as well as against spectrin alpha-II, a specific substrate of calpain.

Our results show that pro-caspase-12 is cleaved into a fragment corresponding to the size of an active caspase-12 during VV infection in BSC-40, HeLa G and 143TK(-) cells. Simultaneously, the cleavage of spectrin alpha-II was observed in VV infected cells. Inhibition of calpain activity by calpastatin peptide or calpain inhibitor V (0.2 and 2 μM) somewhat increased levels of active caspase-12 and decreased cleavage of spectrin alpha-II. The effects of calpain inhibitors on levels of other death substrates like PARP or cytokeratin-18 are currently being analyzed.

### SYNTÉZA A VLASTNOSTI RACEMICKÝCH A OPTICKY ČISTÝCH AZAHELICENŮ

**JIŘÍ MÍŠEK<sup>a</sup>, FILIP TEPLÝ<sup>a</sup>, IRENA G. STARÁ<sup>a\*</sup>, MILOŠ TICHÝ<sup>a</sup>, DAVID ŠAMAN<sup>a</sup>, IVANA CÍSAŘOVÁ<sup>b</sup> a IVO STARÝ<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6. <sup>a</sup>Katedra anorganické chemie, Karlova Univerzita, Albertov 2030, 128 40 Praha 2  
misek@uochb.cas.cz



Azaheliceny jsou helikálně chirální sloučeniny, skládající se z *ortho*-anelovaných benzenových a pyridinových kruhů. Jejich unikátní topologie a elektronické vlastnosti by mohly vést k řadě aplikací v enantioselektivní katalýze, molekulární elektronice, chirálním rozpoznávání apod. Dosud však chybí jednoduchá a obecná metoda přípravy azahelicenů<sup>1</sup>. Z těchto důvodů jsme vyvinuli novou metodu syntézy azahelicenů, která je založena na [2+2+2] cyklotrimerizaci<sup>2</sup>, vychází z jednoduchých stavebních bloků a umožňuje připravit řadu jinak nedostupných izomerů. Příkladem je syntéza 1-aza[6]helicenu 4 (Schéma 1).

Konfiguračně stabilní hexacyklické deriváty byly rozštěpeny na enantiomery a byla určena jejich racemizací bariéra. Schopnost koordinovat přechodné kovy byla demonstrována přípravou stříbrných komplexů, jejichž struktura byla potvrzena rentgenostrukturální analýzou (např. komplex (*P,P*)-5 viz. Obr. 1.). Dále byla zjištěna vysoká protonová afinita u většiny připravených sloučenin.

Další komplexační studie, měření bazicit v roztoku a použití opticky aktivních azahelicenových derivátů v asymetrické katalýze bude dále zkoumáno.

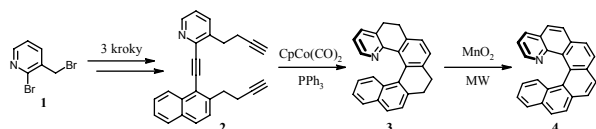
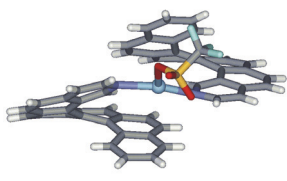


Schéma 1.



Obr. 1.

Podporováno Grantovou agenturou ČR (reg. č. 203/07/1664), Ministerstvem průmyslu a obchodu/Zentiva (reg. č. FI-IM/073) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumné centrum: Biomolekuly a komplexní molekulární systémy, LC05A57).

#### LITERATURA

1. Urbano A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3986 (2003).
2. Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšínský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 13, 2547 (2005).

#### DEGRADACE PCB V ROSTLINNÝCH BUŇKÁCH

**JITKA NAJMANOVÁ<sup>a,b</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a,b</sup>,  
TOMÁŠ MACEK<sup>c,b,a</sup> a LUCIE KOCHÁNKOVÁ<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV

ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>c</sup>Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
najmanoj@vscht.cz

Metabolismus xenobiotik u rostlin lze obecně dělit do třech fází. Aktivační (1. fáze), zahrnuje procesy oxidace, redukce nebo hydrolyzy xenobiotika. Této fázi se účastní několik enzymových systémů, jsou to hlavně systémy monooxygenas (oxidasy) s cytochromem P-450 jako terminální oxidasou a peroxidasy. Ve druhé fázi (konjugační) se reaktivní skupiny xenobiotik spojují s funkčními skupinami endogenních molekul (např. sacharidy, glutathion, aminokyseliny) za účasti transferas. Ve 3. fázi jsou rozpustné nefytotoxické konjugáty ukládány do vakuol. Funkce a mechanismus působení rostlinných enzymů při transformaci xenobiotik však nejsou doposud zcela dostatečně prostudovány. Peroxidasy hrají důležitou roli v celém metabolismu rostliny, kde se účastní řady fyziologických funkcí<sup>1</sup>.

S cílem objasnit funkci rostlinných peroxidas různých druhů při transformaci polychlorovaných bifenyly byly izolovány surové buněčné extrakty z *Nicotiana tabacum* (tabák virginský), *Armoracia rusticana* (křen selský) a *Solanum nigrum* (lilek černý). Surové enzymové extrakty byly částečně purifikovány síranem amonným do 20–80 % nasycení a následně odsoleny. Preparáty kultur *Solanum nigrum* a *Nicotiana tabacum* byly použity pro reakce *in vitro* s individuálními kongenery polychlorovaných bifenyly. Účinnost přeměny se u obou rostlinných druhů lišila, zároveň se projevila různá účinnost přeměny vůči strukturně odlišným kongenerům. Nejvyšší konverze byla u obou dvou druhů analyzována u 4-chlorbifenyly (PCB3), téměř 80 % původní koncentrace (10 μmol/l). Dihydroxy-2,5- dichlorbifenylyl byl identifikován metodou GC-MS jako produkt reakce peroxidasy kultury *Nicotiana tabacum* s 2,5-dichlorbifenyly (PCB9). Naproti tomu produkty reakce peroxidasy kultury *Solanum nigrum* se stejnou sloučeninou byly 2-chlorbifenylyl, trichlorbifenyly a hydroxybenzoové kyseliny.

Během kultivace tkáňové kultury *Nicotiana tabacum* s polychlorovanými bifenyly byly po nativní elektroforese pozorovány změny v isoenzymovém složení peroxidasy. Některé isoenzymy byly přítomností PCB inhibovány, u některých se naopak aktivita zvýšila. Specifická aktivita peroxidasy v 10. dnu kultivace s PCB byla sedmkrát vyšší než u kontroly (bez PCB).

Při kultivaci kultury *Nicotiana tabacum* s PCB-9 v přítomnosti inhibitoru peroxidasy, propylgalátu, byla degradace PCB-9 méně účinná (o 10 %) než bez inhibitoru. Dvě separované isoenzymové frakce kultury *Nicotiana tabacum* prokázaly stejnou účinnost transformace PCB-3.

Tato studie ukázala, že rostlinné peroxidasy jsou schopné metabolizovat PCB na hydroxylované deriváty polychlorovaných bifenyly.

Autoři děkují grantové podpoře MSMT IP05745ME a MSMT Centrum IM06030.

#### LITERATURA

1. Sandermann H.: *Pharmacogenetics* 4, 225 (1994).

**PROTEIN p53 ZASTAVUJE PROLIFERACI  
A INDUKUJE DIFERENCIACI v-MYB  
TRANSFORMOVANÝCH MONOBLASTŮ**

**JARMILA NAVRÁTILOVÁ<sup>a</sup>, VIKTOR HORVÁTH<sup>b</sup>,  
ALOIS KOZUBÍK<sup>a,b</sup>, ANTONÍN LOJEK<sup>a,b</sup>  
a JAN ŠMARDA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU,  
Kotlářská 2, 611 37 Brno; <sup>b</sup>Biofyzikální ústav AV ČR,  
Královopolská 135, 612 65 Brno  
smarda@sci.muni.cz

Protein p53 je transkripční faktor známý pro svůj zásadní vliv na regulaci buněčné proliferace, programované buněčné smrti a diferenciace. V této práci jsme exprimovali exogenní p53 v buňkách linie ptačích monoblastů BM2 transformovaných onkogenem *v-myb* viru ptačí myeloblastózy (AMV). Prokázali jsme, že buňky BM2 produkují mutantní endogenní protein p53. Protože mutantní formy p53 mohou tvořit s p53 wt neaktivní tetramery a působit tak jako dominantně negativní inhibitory funkce p53 wt<sup>1</sup>, exprimovali jsme v buňkách BM2 cDNA kódující lidský protein p53. Tento protein se na mutantní kuřecí protein p53 neváže a tetramery s ním netvoří<sup>2</sup>.

Ukázali jsme, že i přes velmi nízkou sekvenční homologii ptačího a lidského proteinu p53 (53 %) je lidský protein p53 v buňkách BM2 funkční: zastavil proliferaci BM2 ve fázi G2 buněčného cyklu a mírně snížil jejich viabilitu (20 %). Buňky exprimující p53 také vykazovaly zvýšenou produkci reaktivních kyslíkových radikálů, což jsme prokázali NBT testem a testem chemiluminiscence, zvýšenou aktivitu nespecifických esteras, sníženou intracelulární pH a změny exprese povrchových markerů. Všechny tyto znaky svědčí pro to, že lidský p53 vyvolal diferenciaci monoblastů BM2 do stadia monocytů. Zatímco protein p53 si udržel schopnost ovlivňovat diferenciaci buněk BM2, schopnost vyvolat apoptózu jsme neprokázali. Absence apoptózy u buněk BM2 exprimujících lidský p53 patrně souvisí s nedostatečnou schopností tohoto proteinu aktivovat expresi genu *bax*, což jsme prokázali transaktivačními testy. Naše výsledky ukazují, že i výrazné mezidruhové strukturální rozdíly nemusí eliminovat funkci důležitých proteinů. I když lidský protein p53 ztratil schopnost indukce programované buněčné smrti v BM2 buňkách, jeho schopnost regulace proliferace a diferenciace byla i v těchto podmínkách zachována a to dokonce za přítomnosti funkčního onkoproteinu *v-Myb*.

*Tato práce byla sponzorována grantem 301/06/0036 Grantové agentury České republiky a grantem MSM0021622415 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy české republiky.*

**LITERATURA**

1. Chan W. M., Siu W. Y., Lau A., Poon R. Y.: Mol. Cell. Biol. 24, 3536 (2004).
2. Mateu M. G., Fersht A. R.: Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 96, 3595 (1999).

**IZOLACE A CHARAKTERIZACE  
ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ Z LAREV  
MASAŘKY *Neobellieria bullata***

**TEREZA NEUBAEROVÁ<sup>a</sup>, ALICE CIENCIALOVÁ<sup>b</sup>,  
MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ MACEK<sup>a,b</sup>  
a JIŘÍ JIRÁČEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3,  
Praha 6, 166 28; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV  
ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
tereza.neubauerova@vscht.cz

Stále klesající účinnost dosud vyvinutých antibiotik staví do popředí mikrobiologických výzkumů hledání nových látek s antimikrobiálním účinkem, například na bázi krátkých peptidů. Jako zdroj izolace takových peptidů jsme vybrali organismus, který často přichází do střetu s bakteriálními infekcemi – masařku *Neobellieria bullata*.

Indukci antibakteriálních peptidů jsme prováděli bakteriálním pathogenem *Escherichia coli* v larválním stadiu tohoto organismu. Po několika hodinové inkubaci byla získána hemolymfa, ze které byly postupnou centrifugací a různými druhy srážení izolovány nízkomolekulární peptidy. Tyto peptidy byly dále děleny chromatografickými metodami (RP-HPLC, adsorbční a ionexovou chromatografií) na jednotlivé frakce. Identifikace a charakterizace těchto frakcí byla prováděna metodami SDS-PAGE, hmotnostní spektrometrií a N-terminální sekvenací. Konečným krokem bylo porovnání zjištěných sekvencí s databázemi peptidů. Antimikrobiální aktivita frakcí získaných po purifikačních krocích byla testována dvěma metodami. Pro prvotní screening byla použita difúzní metoda, v níž se hodnotí průměry zón vytvořených v důsledku inhibice růstu mikroorganismu. Tato metoda umožňuje jednoduchým způsobem a s velmi malým množstvím testované látky vyřadit neaktivní frakce. Celý průběh růstu mikroorganismu a záznam potenciálního antimikrobiálního účinku získaných peptidových frakcí byl sledován na přístroji BIOSCREEN C. Ten kromě kontinuálního sledování růstu po dobu několika hodin umožňuje i provedení pokusu v několika paralelách. Na základě měření je možné i statistické kvantitativní vyhodnocení inhibice, a to porovnáním tzv. specifické růstové rychlosti a maximální rychlosti testovacího mikroorganismu. Jako testovací modelové mikroorganismy byly vybrány obávané patogeny, zástupci gramnegativních bakterií - *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, grampozitivní zástupce - *Staphylococcus aureus*.

Z výsledků je zřejmá inhibiční aktivita několika frakcí získaných po methanolovém srážení a RP-HPLC, které byly identifikovány v hemolymfě indukovaných larev, zatímco v neindukovaných larvách se tyto frakce nevyskytovaly. Jedna z frakcí (M13) v koncentraci cca 1000 µg.ml<sup>-1</sup> stoprocentně inhibovala růst *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco další frakce M14 inhibovala *S aureus* i *E. coli* a v případě M15 byla inhibice růstu detekována pouze u *Staphylococcus aureus*. Později byly tyto frakce identifikovány jako sapeciny A a C. Účinné koncentrace výše uvedených frakcí se řádově shodovaly s koncentracemi komerčních antibiotik (vankomycin, kanamycin).

*Práce na tomto projektu byla sponzorována granty GAČR 203/05/0832 a grantem FRVŠ 1676 G4/ 2007.*

**OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ PROTEINŮ PŘI STÁRNUTÍ LISTŮ TABÁKU (*Nicotiana tabacum* L.)****PETRA NEUWIRTHOVÁ<sup>a,b</sup> a NAĎA WILHELMOVÁ<sup>b</sup>**<sup>a</sup>Univerzita Karlova, PŘF, Katedra biochemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6  
neuwirthova@ueb.cas.cz

Volné radikály produkované při aerobní respiraci způsobují oxidační poškození, které se s přibývajícím věkem kumuluje, a je tak příčinou stárnutí a smrti. Terčem působení volných radikálů jsou základní buněčné složky – lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Nejčastějším produktem oxidace proteinů jsou sloučeniny s karbonylovou skupinou, aldehydy a ketony, vznikající na řetězcích aminokyselin. Proteiny se liší v citlivosti na poškození volnými radikály. Senescence je také regulovaná fytohormony, např. cytokininy, které jsou považovány za inhibitory senescence.

Sledovaly jsme změny obsahu cytosolických proteinů, jejich oxidační poškození, jakým způsobem je ovlivněno oxidační poškození cytosolických proteinů cytokininy a zda lze nalézt korelaci mezi oxidačním poškozením proteinů a nástupem senescence listu. K pokusům jsme použily rostliny tabáku (*Nicotina tabacum* L.), jak kontrolní, tak transgenní rostliny s pozměněnou koncentrací cytokininů.

V průběhu senescence listů tabáku dochází ke změnám obsahu cytosolických proteinů. Pomocí spektrofotometrických metod a SDS-elektroforézy jsme zjistily, že celkový obsah cytosolických proteinů klesá v listech v závislosti na jejich stárnutí. Nejvíce proteinů obsahují mladé listy, nejméně staré listy tabáku. Nejvíce proteinů obsahují v rostlinné buňce chloroplasty, a tak je přirozené, že se stárnutím klesá i velikost a počet těchto organel. Zastoupení jednotlivých proteinů se však v závislosti na stáří mění. Koncentrace většiny cytosolických proteinů v listech v závislosti na stáří klesá, ale mohou se vyskytovat i proteiny, které jsou v senescenci syntetizovány. V našem případě takovýmto proteinem byl cytosolický protein o velikosti 66 kDa. Kontrolní rostliny obsahovaly v mladých listech více proteinů, než transgenní rostliny, ve starých listech byl ale tento poměr obrácený. To pravděpodobně souvisí s omlazením listů transgenních rostlin v důsledku zvýšené syntézy cytokininů. Tyto výsledky se shodují i se zpomalenou degradací chlorofylů.

Během přirozené senescence listů tabáku dochází také k nárůstu celkového obsahu oxidačně poškozených cytosolických proteinů. Oxidační poškození proteinů jsme měřily pomocí DNPH vázajícího se na karbonylové skupiny a jejich obsah jsme stanovily spektrofotometricky jako koncentraci vzniklého dinitrofenylhydrazonu. Výsledky ukázaly, že průběh koncentrace oxidovaných proteinů má charakter signálu pro spuštění senescence. V nejstarších listech nebylo nejvíce oxidovaných proteinů, protože už v nich docházelo k jejich odbourávání, tzn. už v nich probíhala senescence. Transgenní rostliny vykazovaly obdobné hodnoty, jako kontrolní rostliny. Proto se zdá, že metabolismus oxidovaných proteinů je pravděpodobně řízen

nezávisle na hladině cytokininů a souvisí pouze s věkem listu.

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu financovaného GA ČR (č. 522/03/0312).

**STIMULACE NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ LIPOPOLYSACHARIDEM JE SPOJENA S FOSFORYLACÍ REGULAČNÍ PODJEDNOTKY p47phox NADPH OXIDASY****KATEŘINA OKÉNKOVA<sup>a,b</sup>, ROMAN KONOPKA<sup>a,b</sup>, a LUKÁŠ KUBALA<sup>a</sup>**<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; <sup>b</sup>Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Oxidativní vzplanutí fagocytů, charakteristické intenzivní produkcí volných kyslíkových radikálů, je indukováno řadou prozánětlivých mediátorů. Za zvýšenou produkcí volných radikálů je zodpovědná NADPH oxidasa. Během stimulace fagocytů dochází k aktivaci jednotlivých podjednotek NADPH oxidasy spojených s jejich fosforylací a změnou lokalizace vazbou na membránu fagozomu, přesný mechanismus stimulace však není znám. Proto jsme se zaměřili na lipopolysacharidem indukovanou aktivaci NADPH oxidasy v lidských neutrofilních granulocytech a myších makrofázích RAW 264.7. Oxidativní vzplanutí bylo detekováno luminolem-amplifikovanou chemiluminiscencí s použitím různých aktivátorů -opsonizovaného zymosanu (OZP), forbol myristát acetátu (PMA), kalciového ionoforu (CaI) a bakteriálního peptidu *N*-formylmethionyl-leucyl-fenylalaninu (FMLP), spouštějících oxidativní vzplanutí odlišnými mechanismy. Byla sledována fosforylace klíčové podjednotky NADPH oxidasy p47phox a vliv inhibitorů ERK1/2 a p38 kinas na lipopolysacharidem indukovanou fosforylací p47phox. Lipopolysacharidem indukovaná stimulace byla zjištěna jak u lidských neutrofilních granulocytů, tak myších makrofágů RAW 264.7 a byla rovněž spojená s výrazným zesílením oxidativního vzplanutí - toto zesílení bylo rozdílné u jednotlivých aktivátorů. Stimulace fagocytů korelovala se zvýšením fosforylace p47phox, která byla ovlivněna inhibitory vybraných kinas. Výsledky prokázaly, že stimulace fagocytů lipopolysacharidem, vedoucí ke zvýšení oxidativního vzplanutí, je spojena s fosforylací regulační podjednotky p47phox.

**OVER-EXPRESSION OF HUMAN ASPARTYL (ASPARIGINYL)  $\beta$ -HYDROXYLASE IN LEUKEMIA****EVA OTÁHALOVÁ<sup>a</sup>, MICHAEL S. LEBOWITZ<sup>b</sup>, and HOSSEIN A. GHANBARI<sup>b</sup>**<sup>a</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague; <sup>b</sup>Panacea Pharmaceuticals, Inc., 207 Perry Parkway, Gaithersburg, MD 20877, USA

Human aspartyl (aspariginyl)  $\beta$ -hydroxylase (HAAH) has been established as an excellent biomarker for cancer diagnosis based on its biochemical and cellular properties and known biological function. The enzyme normally catalyzes a protein modification, the  $\beta$ -hydroxylation of aspartyl and/or aspariginyl residues found in EGF-like domains of blood clotting factors, proteins of the extracellular matrix and various cellular signaling proteins<sup>1</sup>. Increased HAAH expression has been detected at the protein and mRNA levels specifically in tumor cells. Overexpression of HAAH results in its translocation to the cellular surface<sup>2</sup> where it is a potential target for antibody-based cancer therapy.

By immunohistochemical staining we identified HAAH over expression in more than 20 different types of cancer, including leukemias. HAAH was not detected to an appreciable extent in normal tissues including non-cancerous (benign) proliferative disorders. We identified the HAAH protein by ELISA and Western blotting in the serum of cancer patients. The protein was undetectable in sera from non-diseased individuals and thus serum protein levels of HAAH are diagnostic for cancer. To detect HAAH at the mRNA level we developed a quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Treatment of cancer cells with anti-HAAH monoclonal antibodies (anti-HAAH mAbs) in vitro lead to the loss of malignant phenotype - proliferation, motility and invasiveness.

We found increased expression of the HAAH transcript (~5-fold and ~10-fold) in leukocytes from patients with both chronic myelogenous leukemia (CML) and acute myelogenous leukemia (AML) respectively. In case of AML we studied HAAH as a possible marker to diagnose and monitor disease treatment as well as minimal residual disease. In the case of CML we have proven HAAH to be a suitable tool for the determination of responders and non-responders to Imatinib therapy prior to the initiation of treatment. For this purpose we have developed a clinically proven assay to follow HAAH transcript changes caused by the presence of Imatinib. Furthermore we studied influence of anti-HAAH mAbs on primary cells driven from patients with AML and CML.

We proved HAAH to be a suitable tool for the determination of likely response to Imatinib during CML treatment. HAAH may also be helpful in AML monitoring.

#### REFERENCES

1. Lavaissiere L., Jia S., Nishiyama M., de la Monte SM., Stern AM., Wands JR., Friedman P.A.: *J. Clin. Invest.* 98, 1313 (1996).
2. Ince N., de la Monte S. M., Wands J. R.: *Cancer Res.* 60, 1261 (2000).

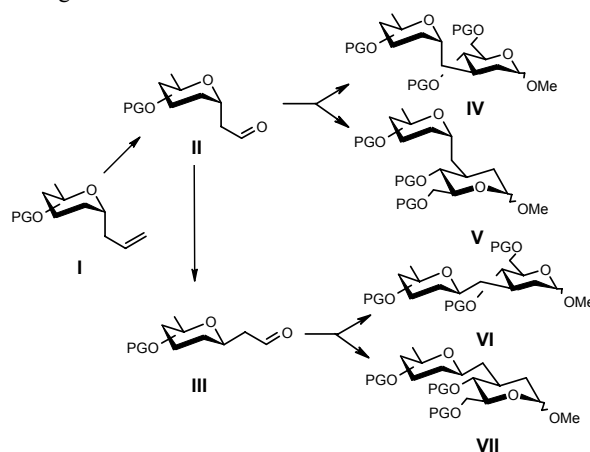
#### VYUŽITÍ $\alpha$ -GLYKOPYRANOSYLPROPENŮ PRO STEREOSELEKTIVNÍ SYNTÉZU (1 $\rightarrow$ 3)-C-DISACHARIDŮ

**KAMIL PARKAN** a **LADISLAV KNIEŽO**

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 parkank@vscht.cz*

V posledních letech je věnováno velké úsilí nalezení nových syntetických cest směřujících k C-disacharidům, analogům přírodních disacharidů<sup>1</sup> a potenciálním inhibitorům glykosidas a glykosyltransferas. Spojení dvou monosacharidů přes methylenový můstek, kterým se C-disacharidy liší od přírodních disacharidů, způsobuje jejich rezistenci jak ke kyselé, tak i enzymatické hydrolyze.

Potenciálem námi navržené syntézy je možnost připravit ze snadno dostupných  $\alpha$ -glykopyranosylpropenů I s vysokou stereoselektivitou až čtyři diastereomerní (1 $\rightarrow$ 3) C disacharidy, ve kterých je příslušný  $\alpha$ -glykopyranosylový nebo  $\beta$ -glykopyranosylový zbytek vázáný přes methylenový můstek s 2,3-dideoxy arabino-hexopyranosou v D nebo L konfiguraci.



Výchozí  $\alpha$ -glykopyranosylpropen I byl ozonolýzou snadno transformován na chráněný  $\alpha$  glykopyranosylacetaldehyd II, který jednoduchou epimerizací poskytl  $\beta$ -glykopyranosylacetaldehyd III. Z obou aldehydů II a III byly po Wittigově reakci a následné enantioselektivní cykloadiční reakci<sup>2</sup> získány čisté stereoisomery substituovaného dihydropyrany, které ve dvou dalších krocích poskytly čisté C-disacharidy IV a V, resp. VI a VII.

*Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT č. 6046137305.*

#### LITERATURA

1. Dondoni A., Marra A.: *Chem. Rev.* 104, 2557 (2004).
2. Vích O., Kniežo L., Dvořáková H., Raich I. Valenta Š.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 2086 (2005).

#### MAPOVÁNÍ STRUKTURY INTERAKTOMU PROTEINU 14-3-3 ZA POMOCI BIKONJUGAČNÍCH TECHNIK A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**KATEŘINA PEŠLOVÁ<sup>a,b</sup>**, **PETR NOVÁK<sup>b</sup>**, **TOMÁŠ OBŠIL<sup>c</sup>**, **PETR HOĐEK<sup>a</sup>** a **MIROSLAV ŠULC<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>PřF UK, katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2; <sup>b</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; <sup>c</sup>Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4.  
peslova@biomed.cas.cz

Proteiny 14-3-3 tvoří širokou rodinu eukaryotických, dimerických proteinů, které se podílejí na regulaci mnoha buněčných procesů, mj. regulují signální dráhy nebo apoptózu, interakcí s klientními molekulami prostřednictvím fosfoserinového/fosfotreoninového vazebného motivu. Vazebná schopnost proteinů 14-3-3 je zcela závislá na dimerické struktuře, která je *in vivo* regulována cílenou fosforylací aminokyselin nacházejících se na rozhraní dimeru. Cílem této práce byla validace experimentálních a teoretických modelů<sup>1,2</sup> struktury proteinu 14-3-3 pomocí progresivní metody chemických modifikačních činidel v kombinaci s analýzou získaných kovalentních aduktů technikou hmotnostní spektrometrie.

Nejprve byly provedeny optimalizační experimenty pro síťovací reakci s činidlem EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid), které vytváří spojení blízkých lysinových zbytků a *N*-konce, s *C*-koncem nebo postranními aminokyselinovými řetězci kyseliny asparagové a glutamové. Nejlepší podmínky byly nalezeny na základě vyhodnocení 1D elektroforeogramů a produkty těchto reakcí byly charakterizovány na peptidové úrovni po proteolýze v gelu hmotnostní spektrometrií. Stejný postup byl použit také pro biokonjugační reakce s bifunkčními síťovacími činidly DSG (*N*-hydroxysukcinimidyl glutarát) a DSS (*N*-hydroxysukcinimidyl suberát) vytvářející vazby mezi prostorově přiblíženými lysinovými zbytky. Kromě přirozeného, rekombinantního proteinu 14-3-3zeta byla za stejných podmínek biokonjugačních reakcí s uvedenými činidly studována také struktura mutovaného 14-3-3zeta se změnou serinu na pozici 58, který je jedním z *in vivo* regulačních míst. Výsledky z 1D elektroforeogramů ukazují, že mutant Ser(58)Asp není schopen vytvářet dimery, a potvrzují tak kritickou úlohu tohoto zbytku pro katalytickou aktivitu proteinu 14-3-3. Tento mutant byl také používán ve všech biokonjugačních experimentech pro porovnání míry interakce podjednotek proteinu 14-3-3 v různých reakčních podmínkách.

Hmotnostní analýzou (MALDI-TOF; LC-FTMS – z angl. Liquid Chromatography Fourier Transformation Mass Spectrometry) byly identifikovány intramolekulární a intermolekulární můstky v molekule proteinu 14-3-3zeta. Dle našich výsledků je *N*-terminální oblast jedné podjednotky prostorově více přiblížená k helixu D druhé monomerní jednotky, oproti krystalografickému modelu<sup>2</sup>.

Obdobným přístupem je v naší laboratoři studována také interakce proteinu 14-3-3 s regulační doménou tyrosin hydroxylasy, která byla popsána jako jeden z vůbec prvních reakčních partnerů proteinů 14-3-3.

Tato práce byla finančně podporována grantem GA ČR(303/06/0928), institucionálním záměrem AV0Z50200510 a výzkumným centrem MŠMT Lc545.

## LITERATURA

1. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R. J., Fu H., Liddington R.: *Nature* 376, 191 (1995).
2. Obšil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S., Dydá F.: *Cell* 105, 257 (2001).

## VYUŽITÍ PIEZOELEKTRICKÝCH BIOSENZORŮ KE STANOVENÍ IMUNOGLOBULINŮ

**MIROSLAV POHANKA<sup>a,b</sup>, OTO PAVLIŠ<sup>a</sup>  
a PETR SKLÁDAL<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Centrum biologické ochrany, 561 66 Těchonín; <sup>b</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Měření piezoelektrickými biosenzory patří k perspektivním metodám v oblasti imunodetekcí. Při konstrukci piezoelektrických biosenzorů se využívá standardní QCM (Quartz Crystal Microbalance), na jejichž zlatou elektrodu se kovalentně imobilizuje antigen příslušný ke stanovované protilátce. Díky piezoelektrickému jevu se vazba protilátky na antigen projeví fyzikálně měřitelnou veličinou – změnou frekvence kmitání. Velkou výhodou použité metody je absence potřeby jakéhokoliv značení či použití sekundární protilátky. Sledování vazby protilátky na antigen probíhá v reálném čase a z vazebných křivek je možno vypočítat základní kinetické konstanty. Tyto biosensory byly použity k modelové detekci specifických protilátek při probíhající tularemické infekci u laboratorních myši BALB/c a také k výběru a charakterizaci monoklonálních protilátek v rámci jejich přípravy.

Na QCM zlatou elektrodu, modifikovanou cysteaminem, byl pomocí glutardialdehydu vázán antigen připravený mrazícím cyklem z mikroorganismu *Francisella tularensis* LVS. Jako měřený vzorek posloužily myši séra nakažených tularemii (IMS) inokulací dávky LD<sub>50</sub>, normální myši séra (NMC) a jako kontrola séra z myši, do nichž byl inokulován mikroorganismus *E. coli* (CMS). Během pětiminutového nanášení séra v plnoprůtočné cele bylo možno detekovat protilátky v IMS třetí den po inokulaci na hladině významnosti 0,95 (t-test, n=3) signálem 75 Hz, od pátého dne na hladině významnosti 0,99 signálem přes 80 Hz.

Pro charakterizaci monoklonálních protilátek (mAb) specifických proti *F. tularensis* byl použit senzor s lipopolysacharidovou (LPS) frakcí antigenu připraveného extrakcí v EDTA – Tris-HCl pufru z *F. tularensis* a pro účely negativní kontroly z *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Tímto způsobem byly testovány kinetické parametry a specifičnost experimentálně připravené mAb. Rovnovážná konstanta  $K_a$  afinitní reakce pro protilátku 4H3BD3 byla stanovena 70492±6207, přičemž disociační konstanta reakce  $k_d$  činila 0,00644±0,00026 s<sup>-1</sup>. Negativní kontrola získaná z biosenzoru s imobilizovaným LPS z *E. coli* nebo *B. subtilis* byla méně než 0,5 % oproti signálu z biosenzoru s LPS z *F. tularensis*. Byl rovněž sestaven graf pro přepočítání signálů na titer získaný metodou ELISA.

Analýza imunoglobulinů jak v klinické, tak v technologické oblasti je v současnosti možná jen s pomocí složitých

a materiálně náročných metod. Použití piezoelektrických biosenzorů poukazuje na možnost využití jednoduché aparatury v kombinaci s měřením nenáročným na reagenty.

## FLUORESCENČNÍ SENZORY PRO ANIONY A ZPŮSOBY ZVÝŠENÍ JEJICH CITLIVOSTI

**RADEK POHL<sup>a</sup> a PAVEL ANZENBACHER Jr.<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Center for Photochemical Science, Bowling Green State University, Bowling Green, Ohio 434 03, USA  
pohl@uochb.cas.cz

Vývoj citlivých senzorů pro aniony zůstává stále výzvou pro chemiky. Hlavním důvodem je fakt, že anorganické aniony, na rozdíl od anorganických kationů, vykazují různou geometrii, značnou delokalizaci náboje a solvataci, a následkem toho je vázání anionů na senzor méně účinné. Senzory založené na změně fluorescence vyvolané vazbou anionu na senzor jsou zvláště atraktivní, protože jsou velmi citlivé při malé koncentraci analytu. Celkovou odezvu senzoru na přítomnost anionu lze zlepšit buď zvýšením afinity senzor-anion nebo prostřednictvím citlivějšího přenosu signálu. První přístup znamená často složitou několikastupňovou syntézu cílového senzoru a ztrátu odezvy v reálném čase z důvodu pomalé disociace komplexu senzor-anion.

V našem příspěvku<sup>1</sup> jsme se zaměřili na zvýšení citlivosti již známého fluorescenčního senzoru pro aniony – DPQ<sup>2,3</sup> (2,3-di(1*H*-2-pyrrolyl)chinolalinu). Prvním přístupem je připojení chromoforu, který je vhodný pro rezonanční přenos excitační energie, na původní DPQ senzor. Druhým přístupem je připojení konjugovaného chromoforu na původní senzor, což umožňuje delokalizaci excitovaného stavu konjugovaného systému. Oba přístupy umožňují zvýšit citlivost modifikovaných DPQ senzorů, což umožňuje používat tyto senzory v několikanásobně menším množství než původní DPQ senzor a snížit detekční limit pro některé aniony.

### LITERATURA

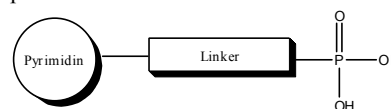
1. Pohl R., Aldakov D., Kubát P., Jursíková K., Marquez M., Anzenbacher P. Jr.: *Chem. Commun.* 2004, 1282.
2. Black C. B., Andrioletti B., Try A. C., Ruiperez C., Sessler J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 10438 (1999).
3. Anzenbacher P. Jr., Try A. C., Miyaji H., Jursíková K., Lynch V. M., Marquez M., Sessler J. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10268 (2000).

### NOVÉ MOŽNOSTI PYRIMIDINOVÝCH ACYKlickÝCH FOSFONÁTŮ V PROTINÁDOROVÉ CHEMOTERAPII: SYNTÉZY POTENCIÁLNÍCH MULTISUBSTRÁTOVÝCH INHIBITORŮ THYMINFOSFORYLASY

**KAREL POMEISL, ANTONÍN HOLÝ,  
IVAN VOTRUBA a RADEK POHL**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám 2, 166 10, Praha  
pomeislk@uochb.cas.cz

Acyklické nukleosidové fosfonáty (ANP) představují významné sloučeniny z hlediska jejich farmakologického využití, neboť se vyznačují širokou škálou biologických aktivit<sup>1</sup> např. proti některým DNA-virům a retrovirům. V současnosti se náš výzkum zaměřuje také na syntézu katabolicky stálých pyrimidinových ANP derivátů, které jsou navrhovány jako nové typy potenciálních multisubstrátových inhibitorů thymidinofosforylasy<sup>2-4</sup>. Jelikož tento enzym plní důležitou roli v procesu angiogeneze, mohly by v budoucnu nalézt tyto sloučeniny uplatnění např. v protinádorové chemoterapii.



Obr. 1

V této studii jsme navrhli několik typů pyrimidinových ANP sloučenin, u kterých jsme současně sledovali jejich inhibiční aktivitu vůči thymidinofosforylase. Na základě biochemických výsledků jsme se dále pokusili modifikovat jejich strukturu s cílem ovlivnit inhibiční účinek v různých směrech, abychom tak lépe porozuměli jejich vztahu k struktuře enzymu. V mnoha případech byla a stále je tato snaha povzbuzována i vývojem takových syntetických postupů, které se vyznačují svojí jednoduchostí (např. fluorace ANP sloučenin<sup>2,3</sup>, cross-coupling reakce atd.) či nízkou toxicitou produktů způsobenou toxickými nečistotami.

Tato studie byla podporována grantem GA ČR (Centrum Nová antivirologika a antineoplasmatika (1M0508), Evropské Unie (Descartes Prize HPAW-CT-2002-9001) a Gilead Sciences (Foster City, CA, USA).

### LITERATURA

1. Holý A.: *Curr. Pharm. Design.* 9, 2567 (2003); b) Holý A. *In Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy* (Chu C. K., ed.) Elsevier, Amsterdam 2002, str. 167.
2. Votruba I., Pomeisl K., Tloušťová E., Holý A., Otová B.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 1517 (2005).
3. Pomeisl K., Pohl R., Holý A., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 1465 (2005).
4. Pomeisl K., Pohl R., Holý A., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 595 (2006).

### YEAST ADENINE DEAMINASES

**HANA POSPÍŠILOVÁ and IVO FRÉBORT**

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc  
hana.pospisilova@upol.cz

Cytokinins are plant hormones, which play important role in plant development. Their level in plant tissues is controlled by the enzyme cytokinin dehydrogenase (CKX, EC 1.5.99.12)<sup>1</sup>. According to older reports<sup>2</sup>, some yeast and mammalian enzymes can cleave a cytokinin (or its derivative) to hypoxanthine and an amine derived from the N6 side-chain. We are searching for enzymes involved in such an alternative pathway of the cytokinin degradation that may be acting in plants and possibly also cleaving cytokinin-derived drugs in human cells<sup>3</sup>. Of this class of enzymes, bacterial adenine deaminase (ADE, EC 3.5.4.2; deamination of adenine to hypoxanthine and ammonia) was recently the first to have the crystal structure solved<sup>4</sup>, but no structure of eukaryotic adenine deaminase is available yet. On the amino acid sequence level, ADEs found in lower eukaryotes, such as Ascomycetes<sup>5</sup>, show higher degree of similarity with human adenosine deaminase (EC 3.5.4.4), which is being intensely studied for their participation in many diseases, than with prokaryotic enzymes.

Hence, yeast adenine deaminases SPBC1198.02 (*Schizosaccharomyces pombe*) and AAH1 (*Saccharomyces cerevisiae*) were chosen for the study due to their less complex genetic origin and partial amino acid sequence similarity to plant and animal enzymes. Full gene sequences that contain no introns were amplified by PCR from DNA of the yeasts, cloned into pDRIVE vector and replicated in *E. coli* TOP10 cells. Restriction analysis followed by sequence analysis confirmed correctness of the inserts. The genes were then cloned into pET101/D-TOPO expression vector under IPTG inducible promoter. The vector also facilitated the fusion of C-termini of the recombinant proteins to V5 epitope domain and 6xHis tag. The proteins produced in *E. coli* BL21 Star™(DE3) cells were detected in the cell extract by Western blotting with the antibody against the V5 epitope and purified by one step affinity chromatography on Ni-NTA. Optimum conditions for activity assay using UV monitoring of the substrate/product concentrations were found and specific activities and  $K_m$  values determined for both enzymes. Cytokinin degradation was observed only for the *S. pombe* enzyme. Large scale preparations of the enzymes for crystallographic trials are under way.

Supported by the grants MSM 6198959216 and GACR 522/06/0022.

#### REFERENCES:

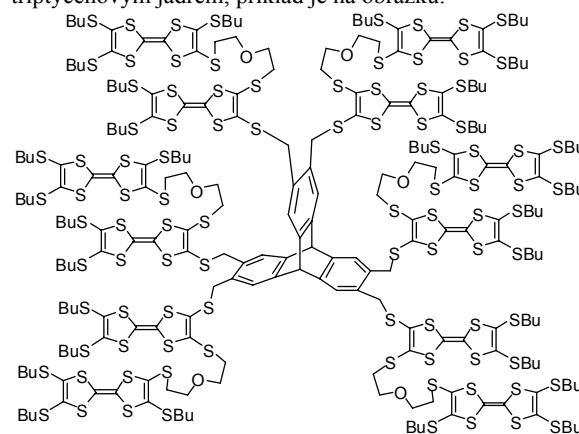
- Galuska P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmülling T., Frébort I.: *Eur. J. Biochem.* 271, 3990 (2004).
- Dorée M. M., Terrine C.: *Physiol. Veg.* D. 275, 1503 (1972).
- Trávníček Z., Maloň M., Zatloukal M., Doležal K., Strnad M., Marek J.: *J. Inorg. Biochem.* 94, 307 (2003).
- Sugadev R., Kumaran D., Burley S. K., Swaminathan S.: *Crystal structure of an adenine deaminase*. New York Structural Genomics Research Consortium (Nysgrc), 2006/9/13 (PDB access 2ICS).
- Deeley M. C.: *J. Bacteriol.* 174, 3102 (1992).

## SYNTEZA A VLASTNOSTI OLIGOMERNÍCH DERIVÁTŮ TETRATHIAFULVALENU S TRIPTYCENOVÝM JÁDREM

JIŘÍ RYBÁČEK<sup>a,b</sup>, PETR HOLÝ<sup>a</sup>, JIŘÍ ZÁVADA<sup>a</sup>, KRISTINE KILSA<sup>b</sup> a MOGENS B. NIELSEN<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup> Dept Chemistry, University of Copenhagen, Universitetsparken 5, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

Tetrathiafulvalen (TTF) představuje elektronově bohatou strukturální jednotku hojně využívanou v materiálovém inženýrství či supramolekulární chemii<sup>1</sup>. Za svou popularitu vděčí TTF nejen výborné syntetické dostupnosti mnoha jeho derivátů, ale především svým redoxním vlastnostem. Lze jej totiž snadno oxidovat ve dvou zpravidla vratných jednoelektronových krocích nejprve na radikál-kation a posléze na dikation. Za účelem studia vzájemného vlivu TTF jednotek různým způsobem rozložených v prostoru byla připravena série oligomerních (1 až 12 TTF jednotek) derivátů s geometricky výhodným triptycénovým jádrem, příklad je na obrázku.



Bis-, tetrakis- a hexakis(brommethyl)triptyceny se substitučním motivem ftalové či tereftalové kyseliny byly připraveny jednoduchým sledem reakcí (esterifikace, redukce a záměna hydroxyly za brom) z příslušných triptycénkarboxylových kyselin, jejichž syntéza byla již dříve vypracována v naší skupině<sup>2</sup>. Následně byly těmito reaktivními halogenderiváty alkylovány mono- a dithioláty odvozené od příslušných tetrathiafulvalen-2,3,6,7-tetrathiolů. Elektrochemickými a spektroelektrochemickými měřeními byl studován vztah mezi polohou půlvlnných potenciálů a absorpčních maxim oxidovaných částic a počtem a prostorovým uspořádáním TTF jednotek.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087) a Danich Research Agency (grant #2111-04-0018).

#### LITERATURA

- Nielsen M. B., Lomholt C., Becher J.: *Chem. Soc. Rev.* 29, 153 (2000).

2. Rybáčková M., Bělohradský M., Holý P., Pohl R., Závada J.: *Synthesis* 12, 2039 (2006).

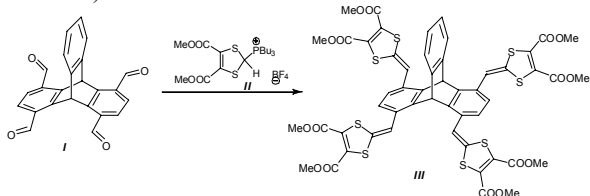
## VYUŽITÍ TRIPTYCENKARBOXYLOVÝCH KYSELIN K SYNTÉZE OLIGOMERNÍCH DERIVÁTŮ 1,4-DITHIAFULVENU

MARKÉTA RYBÁČKOVÁ<sup>a,b</sup>, JIŘÍ RYBÁČEK<sup>a,b</sup>, MARTIN BĚLOHRADSKÝ<sup>a</sup>, PETR HOLÝ<sup>a</sup>, JIŘÍ ZÁVADA<sup>a</sup>, KRISTINE KILSÁ<sup>b</sup> a MOGENS B. NIELSEN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Dept of Chemistry, University of Copenhagen, Universitetsparken 5, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

Tetrathiafulvalen je snadno oxidovatelný elektronový donor, který našel díky svým užitečným vlastnostem široké uplatnění v materiálové a supramolekulární chemii<sup>1</sup>. Rozšíření konjugace pomocí olefinické, acetylenické nebo aromatické spojky vedlo k řadě derivátů s optimalizovanými vlastnostmi<sup>2</sup>. Triptycenkarboxylové kyseliny<sup>3</sup> představují rigidní stavební bloky, které jsou snadno dostupné ve dvou reakčních krocích ze substituovaných anthracenů a ukázaly se jako vhodné intermediáty pro syntézu řady funkčních derivátů triptycenu.

Fischerovu esterifikaci připravené estery lze snadno zredukovat účinkem LiAlH<sub>4</sub> na hydroxymethyltriptyceny a ty pak parciální oxidací (působením PCC nebo Swernovou oxidací) převést na odpovídající aldehydy. Wittigovou nebo Wittigovou-Hornerovou<sup>4</sup> reakcí takto připravených aldehydů s fosfoniovou solí **II** nebo obdobným fosfonátem byla připravena řada triptycenum rozšířených derivátů tetrathiafulvalenu (příklad je uveden v následujícím schématu).



Elektrochemická měření ukázala, že u všech připravených látek dochází k dvěma nevratným oxidačním krokům. Připravené látky by v budoucnu mohly najít uplatnění v supramolekulární chemii při tvorbě komplexů.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087) a Danich Research Agency (grant #2111-04-0018).

### LITERATURA

- Nielsen M. B., Lomholt C., Becher J.: *Chem. Soc. Rev.* 29, 153 (2000).
- Nielsen M. B., Utesch N. F., Moonen N. N. P., Boudon C., Gisselbrecht J. P., Concilio S., Piotto S. P., Seiler P., Günter P., Gross M., Diederich F.: *Chem. Eur. J.* 8, 3601 (2002).

- Rybáčková M., Bělohradský M., Holý P., Pohl R., Závada J.: *Synthesis* 12, 2039 (2006).
- Salle M., Belyasmine A., Gorgues A., Jubault M., Soyer N.: *Tetrahedron Lett.* 32, 2897 (1991).

## CHIRÁLNÍ MESO-SUBSTITUCE CALIX[4]PYRROLOVÝCH MAKROCYKLŮ

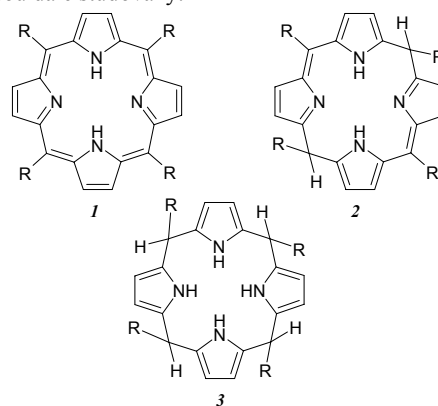
ONDŘEJ ŠIMÁK<sup>a,b</sup>, PAVEL DRAŠAR<sup>b</sup>, VLADIMÍR KRÁL<sup>c</sup> a PAVEL MARTÁSEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Klinika dětského a dorostového lékařství, I.LF UK v Praze, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav chemie přírodních látek, a <sup>c</sup>Ústav analytické chemie, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Ondrej.Simak@vscht.cz

Sloučeniny, ve kterých je aktivní struktura (farmakofor, chromofor, a.j.) spojena s vektorem typu peptidového, oligonukletidového, či sacharidového<sup>1</sup> 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 porfyrinu, jsou díky svým unikátním vlastnostem studovány mimo jiné i jako senzibilizátory pro fotodynamickou terapii či pro silné interakce s DNA a nukleotidy<sup>2</sup>.

Cílem práce je konstrukce konjugátů se spojením porfyrin-sacharid **1**, ve kterých je cukerný skelet připojen k makrocyklu v *meso* poloze pomocí C-C vazby, která je na rozdíl od klasické *O*-glykosidové vazby odolná vůči hydrolytickému, potažmo enzymovému štěpení. Kromě toho jsou studovány i *meso*-1,1-binaftylové calix[4]fyriny **2**, které mohou sloužit pro selektivní rozpoznávání sacharidů, ale i oligosacharidů v roztocích<sup>3</sup>.

V neposlední řadě se podařilo připravit *meso*-*C*-„glykosylované“ calix[4]pyrroly **3**. Ty mají díky flexibilitě pyrrolového jádra schopnost přizpůsobit se komplexovanému ligandu. Jejich spojení s chirálními sacharidy může pozitivně ovlivnit selektivitu komplexačních reakcí a zvýšit rozpustnost těchto látek v polárních systémech. Všechny látky jsou dále studovány.





Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT č. 6046137305, projektu IP04OCD31.001 a grantu GA ČR 2003/06/0006.

#### 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.
3. Král V., Sessler J. L., Zimmerman R. S., Seidel D., Lynch V., Andrioletti B.: *Angew. Chem.* 112, 1097 (2000).

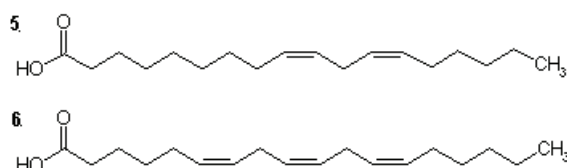
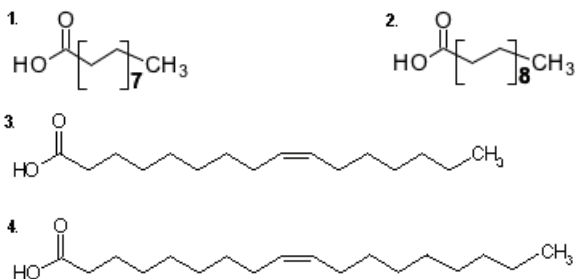
### VLIV HNOJENÍ DUSÍKEM A FOSFOREM NA OBSAH OLEJE A MASTNÝCH KYSELIN U SLUNEČNICE ROČNÍ (*Helianthus annuus* L.)

#### PETR ŠKARPA

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
pskarpa@seznam.cz

Dusík a fosfor se řadí mezi makrobiogenní živiny, ovlivňující řadu metabolických dějů v rostlinném organismu. Dusík se podílí zejména na proteosyntéze, je součástí pyrimidinových a purinových bází důležitých k tvorbě nukleových kyselin. Tvoří důležitou složku chlorofylu, zasahuje do metabolismu vitamínů i dalších biokatalytických látek. Fosfor je především součástí fosfolipidů, fosforylovaných sacharidů a peptidů, nukleových kyselin, adenylátů ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ) a sloučenin ADP, ATP. Jeho podíl na metabolických procesech souvisí s přenosem signálů, využitím a přeměnou energie. Obě tyto živiny mají významnou souvislost s metabolismem rostlinných enzymů, důležitých v biochemii lipidového metabolismu, které katalyzují reakce od acetylkoenzymu A až k výsledným produktům. Nejčastějšími rostlinnými lipidy jsou estery glycerolu a mastných kyselin.

Cílem experimentu bylo zjistit vliv dusíku a fosforu na obsah oleje v nažkách slunečnice a na tvorbu mastných kyselin nasycených (kyselina palmitová **1** a stearová **2**) a nenasyčených (kyselina palmitolejová **3**, olejová **4**, linolová **5** a linoleová **6**).



Experiment byl založen vyšetřím slunečnice odrůdy Jazy formou nádobového pokusu ve 4 variantách (1. kontrola, 2. N v dávce 1g/nádoba, 3. N v dávce 1g/nádoba + P na úrovni 81  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a 4. N v dávce 1g/nádoba + P na úrovni 116  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  zeminy). V průběhu vegetace byly var. 2-4 dohnojeny dusíkem v dávce 1g/nádoba. Po sklizni byl stanoven v nažkách celkový obsah oleje (Twisselmann) a obsah mastných kyselin (plynová chromatografie). Z výsledků je patrné statisticky vysoce průkazné ( $P \leq 0,01$ ) navýšení obsahu oleje oproti kontrole (51,8 % olejnatost), které se projevilo u všech variant hnojených dusíkem (v průměru o více než 6 % rel.). Vliv P na olejnatost nebyla prokázána. Obsah mastných kyselin se pohyboval v rozmezí: kys. palmitová 6,2–6,3 %, kys. stearová 3,4–3,7 %, kys. palmitolejová 0,06–0,07 %, kys. olejová 15,4–16,1 %, kys. linolová 74,1–74,4 % a kys. linoleová 0,12–0,13 %. Aplikace živin se pozitivně projevila pouze u kyseliny olejové. Její obsah se u 2. a 3. varianty zvýšil o více než 2 %, u varianty 4 téměř o 4,5 %. Avšak ani u jedné ze sledovaných kyselin nebyla zjištěna vlivem hnojení signifikantní ( $P \leq 0,05$ ) změna v jejich obsahu.

### VLIV UV ZÁŘENÍ NA BIOCHEMICKÉ PROJEVY APOPTÓZY NEUTROFILNÍCH GRANULOCYTŮ KRVE

#### PETR SLÁMA<sup>a,b</sup>, ZBYŠEK SLÁDEK<sup>a,b</sup> a DUŠAN RYŠÁNEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, <sup>b</sup>Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno  
xslama@node.mendelu.cz

UV záření je obecně považováno za induktor apoptózy buněk. Ke specifickým znakům apoptózy patří biochemické změny, které jsou nejčastěji realizované na cytoplazmatické membráně a v jádře. Biochemické změny, ke kterým dochází při apoptóze na cytoplazmatické membráně, zahrnují translokaci fosfatidylserinu. Fosfatidylserin je základní složkou cytoplazmatické membrány, je umístěn na její vnitřní straně. K translokaci fosfatidylserinu z vnitřní strany cytoplazmatické membrány na její povrch dochází v časném stádiu apoptózy. Tento děj umožňuje rozpoznání apoptotických buněk makrofágy a jejich následné odstranění fagocytózou. Annexin-V je přirozeným ligandem fosfatidylserinu a pokud je konjugován s FITC (fluorescein isothiocyanate), lze detekovat buňky podléhající časnému stádiu apoptózy.

Cílem práce bylo stanovení vlivu UV záření na biochemické projevy apoptózy neutrofilních granulocytů

(neutrofilů) krve *in vitro*. Vzorky krve byly na 30 minut vystaveny účinkům UV záření (germicidní lampa, 30 W, ve vzdálenosti 500 mm) a poté inkubovány jednu hodinu a čtyři hodiny při 37 °C a 5 % atmosféry CO<sub>2</sub>. Pro studium apoptózy byla použita průtoková cytometrie. Apoptotické neutrofilie byly detekovány po předchozím simultánním barvení Annexin-V (FITC) a propidium jodidem.

Byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ( $P < 0,01$ ) v podílu apoptotických neutrofilů mezi kontrolními vzorky a vzorky ovlivněnými UV zářením. Po jedné hodině inkubace bylo zaznamenáno u kontrolních vzorků 11,1 % a po čtyřech hodinách inkubace 16,1 % apoptotických neutrofilů. U pokusných vzorků (UV záření) bylo zjištěno po jedné hodině inkubace 24,1 % a po čtyřech hodinách inkubace 30,3 % apoptotických neutrofilů.

Jak je z výsledků patrné, UV záření je spolehlivým induktorem apoptózy bovinních neutrofilů krve v *in vitro* podmínkách. Po expozici neutrofilů UV záření došlo přibližně k dvojnásobnému zvýšení podílu apoptotických neutrofilů oproti kontrolním vzorkům.

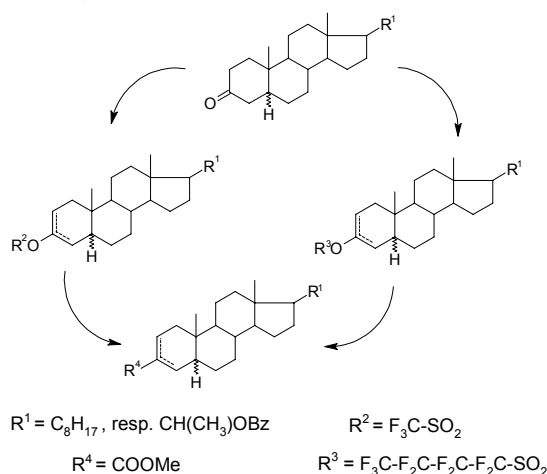
Tato práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MZE 0002716201.

## POUŽITÍ VINYL NONAFLÁTŮ A VINYL TRIFLÁTŮ PŘI Pd-KATALYZOVANÉ ALKOXYKARBONYLACI

EVA ŠTASTNÁ<sup>a,b</sup> a HANA CHODOUNSKÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Katedra organické a jaderné chemie PŘF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
stastna@uochb.cas.cz, hchod@uochb.cas.cz

V současné době je velká pozornost věnována použití vinyl triflátů pro Pd-katalyzované reakce (např. Heckova reakce, Suzukiho či Sonogashirův coupling). Jejich výhodou je snadná příprava z karbonylových sloučenin (např. reakcí s anhydridem kyseliny trifluoromethansulfonové v přítomnosti báze).



Nevýhodou je nestabilita činidla na vzduchu. Proto se zájem obrací k činidlu, které je stabilnější, méně těkavé a jehož deriváty jsou velmi dobrou odstupující skupinou – nonafluorobutansulfonylfluorid<sup>1</sup>.

Triflátová i nonaflátová skupina jsou vhodnými substráty pro Pd-katalyzovanou inserci oxidu uhelnatého za vzniku alkoxykarbonylových sloučenin<sup>1,2</sup>. Uvedená metodika byla vyzkoušena na 5 $\alpha$ -cholestan-3-onu a (20*R*)-3-oxo-5 $\beta$ -pregnan-20-yl benzoátu: 3-oxo skupina těchto ketonů byla převedena na vinyl nonaflát, resp. vinyl triflát. V příspěvku budou diskutovány různé syntetické a stereochemické aspekty uvedených syntéz. Popsané reakce představují vhodný způsob přípravy steroidních derivátů s hydrofilním, metabolicky stabilním substituentem v poloze 3, které jsou allosterickými inhibitory neuronových receptorů<sup>3</sup>.

Práce byla provedena v rámci výzkumného záměru ZA 055 0506, za podpory grantu GA AV IAA4055305.

## LITERATURA

1. Lyapkalo I. M., Högermaier J., Reissig H. U.: *Tetrahedron* 60, 7721 (2004).
2. Skoda-Földes R., Kollár L.: *Chem. Rev.* 103, 4095 (2003).
3. Horák M., Vlček K., Chodounská H., Vyklický L. Jr.: *J. Neurosci.* 137, 93 (2006).

## NAHLÉDNUTÍ DO STRUKTURY A FUNKCE LEKTINU RS20L Z BAKTERIÁLNÍHO FYTOPATOGENU *Ralstonia solanacearum*

ONDŘEJ ŠULÁK<sup>a</sup>, NIKOLA KOSTLÁNOVÁ<sup>a</sup>, JAN ADAM<sup>a</sup>, EDWARD MITCHELL<sup>b</sup>, ANNE IMBERTY<sup>c</sup> a MICHAELA WIMMEROVÁ<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Natl Centre for Biomol. Res. & <sup>d</sup>Dept Biochem., Masaryk University, Kotlářská 2, Brno; <sup>b</sup>E.S.R.F Experiment Division, BP220, F-38043 Grenoble cedex, France; <sup>c</sup>CERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 09, France

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které aglutinují buňky a precipitují 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 inhibitory. Zájem o studium lektinů spočívá v jejich široké paletě vlastností a potenciálních aplikaci (zemědělství, farmakologie, imunologie, léčba rakovinného bujení atd.).

*Ralstonia solanacearum* je bakteriální fytopatogen způsobující hnilobná onemocnění mnoha ekonomicky významných zemědělských plodin, jako jsou například brambory, rajčata, lilek, banány, tabák a mnoho dalších. Největším problémem je, že proti tomuto patogennímu mikroorganismu doposud nebyla objevena účinná terapie a ani nebyla vyšlechtěna dostatečně rezistentní odrůda hospodářských plodin.

Rostlinné a živočišné patogeny využívají protein-sacharidových interakcí ke strategii rozpoznávání a invazi do hostitele. Hlavním smyslem studie je porozumění molekulárním mechanismům, které umožňují patogenní bakterii takto napadat, kolonizovat a ovlivňovat fyziopatologii jejich hostitele. Takovéto studie mohou napomoci k vytvoření koncepce účinného boje proti těmto patogenním agens.

Dle našich dosavadních znalostí, bakterie *R. solanacearum* produkuje tři rozpustné lektiny (RSL, RSIL a RS20L). RSL (MW 9900 Da) jeví cukernou specifitu k L-fukose<sup>2</sup> a částečnou sekvenční homologii s lektinem AAL z houby *Aleuria aurantia*<sup>3</sup>. RS-IL (MW 11601 Da)<sup>4</sup> se podobá strukturou i vlastnostmi lektinu PA-IL z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která je lidským podmíněným patogenem. Liší se však cukernou specifitou<sup>5</sup>. Poslední z této trojice je lektin RS20L (MW 19906 Da), který vykazuje vazebnou schopnost k L-fukose, D-manose a D-xylose.

Tato práce popisuje strukturu a funkční vlastnosti RS20L. Tento lektin nemá sekvenční homologii s žádnou doposud známou aminokyselinovou sekvencí. Přestože vyřešení krystalové struktury naznačilo vysokou strukturní podobnost s živočišnými galektiny, RS20L D-galaktosu nerozpoznává.

Další funkční studie pomocí povrchové plazmonové rezonance (SPR) a mikrokolorimetrických metod umožnily charakterizovat vazebné vlastnosti (afinita, kinetika reakce) a termodynamické parametry.

*Tato práce byla podporována Ministerstvem školství (MSM 0021622413) a Grantovou agenturou ČR (204/03/H016).*

#### LITERATURA

1. Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangelot S., Arlat M., Billault A., Brottier P., Camus J. C., Cattolico L., Chandler M., Choise N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thebault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C. A.: *Nature* 415, 497 (2002).
2. Kostlanova N., Mitchell E. P., Lortat-Jacob H., Oscarson S., Lahmann M., Gilboa-Garber N., Chambat G., Wimmerova M., Imberty A.: *J. Biol. Chem.* 280, 27839 (2005).
3. Wimmerova M., Mitchell E. P., Sanchez J. F., Gautier C., Imberty A.: *J. Biol. Chem.* 18, 27059 (2003).
4. Sudakevitz D., Kostlanová N., Blatman-Jan G., Mitchell E. P., Lerrer B., Wimmerová M., Katcoff D. J., Imberty A., Gilboa-Garber N.: *Mol. Microbiol.* 52, 691 (2004).
5. Mitchell E. P., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M., Gautier C., Perez S., Wu A. M., Gilboa-Garber N., Imberty A.: *Nat. Struct. Biol.* 9, 918 (2002).
6. Seetharaman J., Kanigsberg A., Slaaby R., Leffler H., Barondes S. H., Rini J. M.: *J. Biol. Chem.* 273, 13047 (1998).

#### PROTEOMICKÁ A PEPTIDOMICKÁ CHARAKTERIZACE KLINICKY VÝZNAMNÝCH SPÓR VLÁKNITÝCH HUB HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

**MIROSLAV ŠULC<sup>a,b</sup>, KATEŘINA PEŠLOVÁ<sup>a,b</sup>, MARTIN ŽABKA<sup>b</sup> a VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Přírodovědecká fakulta UK, Katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2;* <sup>b</sup>*Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4*  
*msulc@biomed.cas.cz*

Negativní působení houbových plísní na zdraví člověka zahrnuje alergie, infekční nemoci a mykotoxikózy. Alergie nepříznivě ovlivňují život více jak 20 % populace, systémové mykotické infekce jsou vážným problémem imunokompromitovaných pacientů po transplantacích a po chemoterapiích. Hlavní cestou průniku houbových plísní do lidského organismu je tvorba spor a jejich šíření vzduchem.

Cílem práce je nalezení specifických biomarkerů patogenicity kmenů sporulujících vláknitých hub se zaměřením na kmenově specifické peptidové sekundární metabolity či proteinové makromolekuly na povrchu spor. Kromě jejich identifikace a charakterizace je testována jejich imunomodulační aktivita.

Studovány jsou jak patogenní, tak nepatogenní kmeny sporulujících vláknitých hub rodu *Aspergillus*, *Beauveria*, *Emericella*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Pseudallescheria*, *Stachybotrys* a *Trichothecium*. Kromě přímé analýzy celých houbových spor pomocí MALDI-TOF či extraktů spor metodou hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC (s cílem hledání a optimalizace podmínek přípravy vzorku s aplikací pro rychlou vyšetřovací metodu) jsme použili většinu dostupných proteomických přístupů (1D nebo 2D elektroforéza, enzymové štěpení proteinové skvrny v gelu, charakterizace vzniklé peptidové směsi MALDI-TOF nebo LC-MS/MS analýzou – z angl. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry - s výslednou identifikací proteinu) pro nalezení proteinů, jejichž přítomnost či absence relevantně odlišuje klinicky patogenní kmeny vláknitých hub.

Většina testovaných druhů poskytuje reprodukovatelně poměrně jednoduchá ale specifická MALDI-TOF spektra v nízkém i vysokém rozsahu hodnot *m/z* a tak nabízí možnost využití pro metodu rychlého rozlišení a identifikace kmenů vláknitých hub. Detailní LC-MS/MS analýzou extraktů spor příbuzných kmenů *Beauveria* a *Paecilomyces* byl popsán a charakterizován nový cyklický peptid.

Proteomická analýza studovaných kmenů byla díky absenci genomových databází většiny studovaných kmenů úspěšná pouze LC-MS/MS analýzou. Ta poskytla velmi zajímavé výsledky především pro studovaný a klinicky významný kmen houby *Aspergillus*. Přítomnost identifikovaných proteinů (hydrofobin, superoxid dismutasa [Cu-Zn] a hemolysin) nejen odlišuje jednotlivé kmeny rodiny *Aspergillus* dle historie vzorku (původu) a tedy potenciální patogenicity, ale je i relevantní z pohledu možné virulence pozitivních kmenů a jejich interakce v těle hostitele.

Rychlost, nízký detekční limit a vysoká specifita metody identifikující patogenní kmen jsou základní kameny pro úspěšnou léčbu pacientů či zjištění kontaminace potravin, a hmotnostní spektrometrie jako analytická metoda splňuje všechny tyto požadavky.

*Tato práce byla finančně podporována grantem GA ČR(203/05/P575), institucionálním záměrem AV0Z50200510 a výzkumným centrem MŠMT Lc545.*

## JAK POZNÁME ROSTLINU VHODNOU PRO FYTOREMEDIACI PROSTŘEDÍ ZNEČIŠTĚNÉHO TĚŽKÝMI KOVY?

**VERONIKA ŠUPÁLKOVÁ<sup>a,b</sup>, KAREL STEJSKAL<sup>c</sup>, JOSEF ZEHNÁLEK<sup>a</sup>, ANDREA KLECKEROVÁ<sup>b</sup>, LADISLAV HAVEL<sup>a</sup> a RENÉ KIZEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav chemie a biochemie, <sup>b</sup>Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>c</sup>Katedra biochemie, PFF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
vevek@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

Výsledky studií mechanismů detoxikace a metabolismu toxických těžkých kovů přispívají nejen k lepšímu pochopení základních biologických mechanismů probíhajících v živých organismech, ale také ke tvorbě nových biotechnologických postupů a zařízení. Nedávno byly objeveny rostlinné druhy, které jsou schopny těžké kovy akumulovat bez viditelné deprese a zpomalení růstu. Těto schopnosti je možné využívat právě u fytoremediací, která je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů z životního prostředí. Proti působení těžkých kovů působí v rostlině hned několik různých mechanismů, ale zdá se, že tím nejdůležitějším je syntéza látek bohatých na cystein, především glutathionu a fytochelatinů. Tyto polypeptidy mají základní strukturu  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu ( $\gamma\text{-Glu-Cys}$ ) může opakovat 2 až 11krát (nejčastěji 2-5krát).

Předpokládá se, že rostliny, které mají větší schopnost akumulace těžkých kovů, jsou schopny syntetizovat vyšší množství obranných thiolových sloučenin<sup>1,2</sup>. Proto jsme se v naší práci zaměřili na navržení vhodných technik pro posouzení schopnosti rostlin fytoremediovat půdu znečištěnou těžkými kovy pomocí detekce thiolových látek. Pro tyto účely jsme nejdříve využili techniku zvanou Brdičkova reakce. Použité buněčné suspenzní kultury tabákových buněk BY-2 a explantátové kultury embryí smrku různých klonů byly vystaveny koncentracím kadmiových a olovnatých iontů od 10 po 1 000  $\mu\text{M}$ . Zjistili jsme, že se embryonální kultury vyznačují výrazně vyšší odolností vůči těžkým kovům.

Dále jsme jako experimentální model zvolili rostliny kukuřice, které jsme analyzovali pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí, kde byly limity detekce glutathionu a různých forem fytochelatinů okolo 1 respektive 10 ng/ml. Rostliny kukuřice byly vystaveny šesti různým koncentracím kadmia (50, 100,

150, 200, 400 a 500  $\mu\text{M}$ ) po dobu šesti dnů. Obsah thiolů u všech ovlivněných rostlin se vzrůstající koncentrací aplikovaného kadmia a dobou expozice vzrůstá asi o 500–1800 % (v porovnání s kontrolou). Na konci expozice byl roven přibližně 1700 ng na gram svěží hmotnosti u nejvyšší aplikované dávky. Zatímco obsah  $\text{PC}_2$  mezi třetím a čtvrtým dnem expozice dosáhl svého maxima a poté se již příliš neměnil. A dále v důsledku využívání platinových derivátů jako efektivních cytostatik jsme se rozhodli zkoumat vliv cisplatin (0, 5, 10, 20, 40, 80 a 160  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) na okřehek po dobu pěti dnů. Od třetího dne dochází k výrazné metabolické změně, která je charakteristická prudkým poklesem obsahu volné cisplatin a výrazným vzestupem obsahu thiolových látek.

V této práci je ukázáno, že citlivé analytické techniky mohou sloužit jako nástroje pro charakterizaci různých rostlinných druhů s ohledem na jejich využití ve fytoremediacích.

*Práce na tomto projektu byla podporována granty: GA ČR 522/07/0692 a 1M06030.*

## LITERATURA

1. Petrlova J., Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: *J. Sep. Sci.* 29, 1166 (2006).
2. Potesil D., Petrlova J., Adam V., Vacek J., Klejduš B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R.: *J. Chromatogr., A* 1084, 134 (2005).

## MECHANISM OF GENOTOXICITY OF THE ENVIRONMENTAL POLLUTANT 3-NITROBENZANTHRONE AND ITS METABOLITE 3-AMINOBENZANTHRONE

**MARTINA SVOBODOVÁ<sup>a</sup>, JANA MIZEROVSKÁ<sup>a</sup>, VOLKER M. ARLT<sup>b</sup> a MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Charles University, 128 40 Prague 2; <sup>b</sup>Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey SM2 5NG, UK

3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) is a suspected human carcinogen identified in diesel exhaust and air pollution. The main metabolite of 3-NBA, 3-aminobenzanthrone (3-ABA) has been found in urine samples of salt mine workers occupationally exposed to diesel emissions, demonstrating that human exposure to 3-NBA in diesel emissions can be significant and is detectable. 3-NBA is carcinogenic in rats, causing lung tumours after intratracheal instillation and is also an exceptionally potent mutagen. We identified the phase I and II enzymes, which are responsible for 3-NBA genotoxicity, participating in activation of 3-NBA and 3-ABA. Among the phase I enzymes, the most of the reductive activation of 3-NBA to form DNA adducts in vitro is attributable to NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1), while *N,O*-acetyltransferases (NATs), followed by sulfotransferases SULT1A1 and 1A2, are the major phase II enzymes activating 3-NBA. 3-ABA is oxidatively activated,

predominantly by human hepatic CYP1A1 and 1A2, to form the same DNA adducts as 3-NBA. Kinetics of 3-NBA reduction by NQO1 and that of 3-ABA oxidation by microsomal CYP enzymes was studied in detail. 3-ABA, found to be the main metabolite of 3-NBA in human, is the final reductive metabolite of this carcinogen formed also in vitro, by 3-NBA reduction with NQO1. 3-ABA is oxidized to N-OH-3-ABA derivative, which is responsible for formation of the DNA adducts. Structures of three major adducts were identified as 2-(2'-deoxyadenosin-N6-yl)-3-aminobenzanthrone, N-(2'-deoxyguanosin-N2-yl)-3-aminobenzanthrone and N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthrone. To evaluate the importance of hepatic cytosolic enzymes in relation to microsomal NADPH:cytochrome P450 (CYP) reductase (CPR) in the activation of 3-NBA in vivo, we treated hepatic CPR-null and wild-type C57BL/6 mice with 3-NBA. 3-NBA is predominately activated by cytosolic nitroreductases (NQO1) rather than microsomal CPR. In the case of 3-ABA, CYP1A1/2 enzymes are essential for the oxidative activation of 3-ABA in livers.

Supported GACR (303/05/2195) and MSMT CR (MSM002162080).

#### CHARAKTERIZACE RHIZOSFÉRNÍCH BAKTERIÍ KŘENU SELSKÉHO V PŮDĚ KONTAMINOVANÉ POLYCHLOROVANÝMI BIFENYLY

**ONDŘEJ UHLÍK<sup>a,b</sup>, MILOSLAV ŠANDA<sup>a</sup>,  
KATEŘINA FRANČOVÁ<sup>b</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>b</sup>  
a TOMÁŠ MACEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
ondrej.uhlik@seznam.cz

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou organické sloučeniny obecného vzorce C<sub>12</sub>H<sub>10-x</sub>Cl<sub>x</sub>. Do 80. let byly PCB syntetizovány ve velkém množství. Když se zjistilo, že se akumulují v životním prostředí a mohou mít negativní vliv na lidské zdraví, byla jejich produkce zastavena. Protože chemické či fyzikální metody odstraňování těchto látek z životního prostředí jsou velmi nákladné, pozornost se soustřeďuje k fytořemediaci – využití konsorcií rostlin a jejich rhizosférních bakterií pro degradaci. Rostliny uvolňují do půdy organické látky, které podporují bakterie odbourávající organické kontaminanty; rhizosféra se tak stává dokonalým prostředím pro mikrobiální degradaci polutantu (rhizoremediace).

Jako modelový systém pro izolaci a následnou charakterizaci bakterií degradujících PCB jsme použili křen selský (*Armoracia rusticana*) a jeho rhizosférní bakterie. Protože interakce mezi rostlinou a jejími rhizosférními bakteriemi jsou ovlivněny celou řadou biologických a abiotických podmínek (např. stres způsobený růstem rostliny v kontaminované půdě), byly rostliny ošetřovány roztoky brassinosteroidů – fytohormonů, které napomáhají rostlině překonávat stres. Rhizosférní bakterie byly izolovány

kultivací na minerálním médiu s bifenyly jako jediným zdrojem uhlíku a poté podrobeny analýze ribosomálních proteinů s využitím MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Touto metodou je možné identifikovat bakterie na úrovni rodu, druhu i kmenu. Protože dosud nejsou přístupné databáze s těmito spektry, byla spektra izolovaných bakterií porovnávána se spektry v literatuře již popsaných degradérů PCB (*Burkholderia xenovorans* LB400, *Comamonas testosteroni* B356, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JAB1 a další) a metoda porovnávání spekter rovněž sloužila k monitorování kvalitativních změn v mikrobiotě. Žádný z doposud popsaných degradérů PCB nebyl detekován.

Izolované bakterie byly testovány na přítomnost *bphA1* genu (gen kódující první enzym bifenylového operonu – dráhy, kterou bakterie využívají pro degradaci PCB). Gram negativní nefermentující bakterie byly identifikovány pomocí sady NEFERMtest 24 (Lachema, ČR). Tato metoda se ale ukázala pro tyto účely jako nevhodná, a proto se přistoupilo k identifikaci (příp. klasifikaci) pomocí sekvenace genů kódujících 16S rRNA. Spektra identifikovaných bakterií pak poslouží k vytvoření knihovny, která umožní do budoucna podstatně jednodušší, levnější a rychlejší identifikaci bakterií degradujících PCB.

Tato práce byla podporována projekty MSMOC-111 Cost 859, MŠMT Grant NPVII 2B06156, GAČR 203/06/0563.

#### ANALÝZA TEPLA ZÁVISLÝCH MUTANTŮ p53 V LIDSKÝCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH H1299

**JANA VAŇKOVÁ<sup>a,b</sup>, DIANA GROCHOVÁ<sup>a,b</sup>,  
a JANA ŠMARDOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav experimentální biologie, Biologická sekce, PŘF Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
janca.vanca@seznam.cz

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který v odpověď na buněčný stres transaktivuje své cílové geny a podílí se tak na kontrole buněčného cyklu, regulaci apoptózy a oprav DNA. U více než poloviny lidských nádorů byly nalezeny mutace v genu p53. Nejčastější jsou bodové mutace a to především v centrální doméně p53, která odpovídá za sekvenčně specifickou vazbu na DNA. Tyto mutace mají za následek ztrátu schopnosti proteinu p53 vázat se na DNA v promotorech cílových genů a tím aktivovat jejich transkripci.

Mutace v genu p53 lze detekovat různými metodami, například funkční analýzou separovaných alel v kvasinkách („functional analysis of separated alleles in yeast“ – FASAY), která využívá schopnosti lidského proteinu p53 fungovat i v kvasinkových buňkách *Saccharomyces cerevisiae* jako transkripční faktor a následně transkripcí reportérského genu *ADE2*. Na selekčním médiu pak lze rozlišit bílé kolonie exprimující standardní p53 a červené kolonie exprimující mutantní p53. Výhodou FASAY je, že dokáže odlišit částečně inaktivující mutace p53, např.

teplotně závislé mutace p53, které způsobují růžové zbarvení kvasinkových kolonií.

S využitím metody FASAY jsme shromáždili 23 teplotně závislých (*td*) mutací p53 z různých lidských nádorů. V kvasinkovém expresním systému jsem studovali funkční a konformační vlastnosti *td* mutantů p53 vzhledem ke třem různým responsabilním elementům (RE) odvozeným z promotorových oblastí cílových genů p53 (*p21*, *bax*, *RGC*) ve třech různých teplotách (25, 30, 35 °C). Všechny analyzované varianty p53 jsme dále přechodně exprimovali v lidských nádorových buňkách H1299 odvozených z plicního karcinomu. V nich jsme provedli jejich transkripční a konformační analýzu vzhledem k typu RE (*p21*, *bax*, *RGC*) ve dvou různých teplotách (32, 37°C). Srovnávali jsme vlastnosti *td* mutantů p53 v kvasinkových a lidských buňkách.

Zjistili jsme, že *td* mutantů p53 se chovají velmi podobně jak v lidském, tak i kvasinkovém expresním systému. Vykazují teplotní závislost a diskriminativní charakter (tzn. liší se mírou afinity k různým RE) v lidských i kvasinkových buňkách. Analýza v lidských nádorových buňkách H1299 je citlivější. Zatímco FASAY hodnotí transkripční aktivitu proteinů p53 jen podle barevné škály kvasinkových kolonií, transkripční test v lidských buňkách založený na měření aktivity luciferasy umožňuje přesnější stanovení transkripčních schopností proteinů p53. Také dokáže rozeznat mutanty p53 s vyšší transkripční schopností než má standardní p53.

Podrobné studium různých funkčních variant proteinu p53 může pomoci pochopení procesů a funkce proteinu p53 v nádorových buňkách a navržení nových terapeutik reaktivujících p53.

*Tato práce byla podpořena grantem MSM 0021622415.*

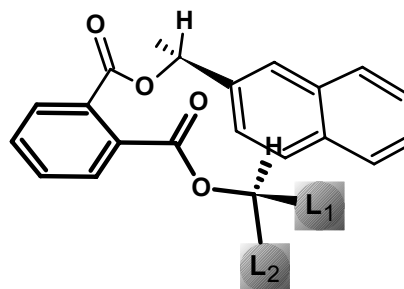
## VYUŽITÍ MONOSUBSTITUOVANÝCH FTALOVÝCH KYSELIN PRO URČENÍ ABSOLUTNÍ KONFIGURACE CHIRÁLNÍCH ALKOHOLŮ POMOCÍ <sup>1</sup>H NMR

**JAN VÁVRA** a **LUDVÍK STREINZ**

*Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Oddělení přírodních látek, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha vavraj@email.cz, streinz@uochb.cas.cz*

Jednokrokovou syntézou bez nutnosti chromatografie byly připraveny aryethylsubstituované ftalové kyseliny, které byly následně použity pro derivatizaci sady chirálních sekundárních alkoholů<sup>1</sup> metodou esterifikace s DCC/DMAP. Byly diskutovány hodnoty rozdílů chemických posunů  $\Delta\delta$  v <sup>1</sup>H NMR v závislosti na přítomném aromátu (Ph, 1-Np, 2-Np). Díky nejvyšším hodnotám ve většině případů byla pro další experimenty vybrána kyselina 2-[[1-(2-naftyl)ethoxy]karbonyl]benzoová. Dále byla zjišťována korelace mezi absolutní konfigurací zkoumaného alkoholu a znaménkem  $\Delta\delta$  příslušných diastereomerních vodíků na základě navrženého modelu (nejpravděpodobnější konformace vypočtena metodou geometrické optimalizace).

Bylo zjištěno, že pravidelnosti hodnot  $\Delta\delta$  umožňují použití činidla pro stanovení absolutní konfigurace sekundárních alkoholů, avšak ukázalo se, že rozdíly posunů nejsou vyšší než např. u Mosherovy kyseliny. Přesto snadná a ekonomicky dostupná syntéza bez nutnosti dělení jednotlivých enantiomerů činidla činí tuto kyselinu zajímavou alternativou.



*Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č.203/05/2141).*

## LITERATURA

1. Seco J. M., Quinoa E., Riguera R.: *Chem. Rev.* 104, 17 (2004).

## IZOLACE, PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE NADPH-DEPENDENTNÍ FENOLHYDROXYLASY KVASINKY *Candida tropicalis* PARTICIPUJÍCÍ NA PRVNÍ FÁZI BIODEGRADACE FENOLU

**L. VILÍMKOVÁ, V. KREMLÁČKOVÁ, J. PÁČA a M. STIBOROVÁ**

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

Při biodegradacích dochází k rozkladu chemických látek prostřednictvím metabolického potenciálu řady mikroorganismů. Jedná se obvykle o metody ekonomické a šetrné k našemu životnímu prostředí. Kvasinka *Candida tropicalis* vykazuje schopnost využívat fenol jako hlavní zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Naše laboratoř pracuje s kmenem Ct2, který byl izolován z kontaminované půdy na Mostecku.

Na prvním kroku degradace fenolu, tedy jeho oxidaci na catechol, participují jak enzymy mikrosomální (systém oxygenas se smíšenou funkcí a cytochromem P450 jako terminální oxidasou), tak cytosolární. Zde se jedná o NADPH-dependentní fenolhydroxylasu (EC 1.14.13.7). Cytosolární NADPH-dependentní fenolhydroxylasa je fenolem indukována, buňky kultivované v mediu obsahujícím fenol vykazovaly zvýšenou aktivitu tohoto enzymu.

Izolace NADPH-dependentní fenolhydroxylasy byla optimalizována na následující čtyři kroky: chromatografií na sloupci DEAE-Sepharosy (k eluci proteinů byl použit gradient NaCl), rechromatografií na stejném nosiči, frakční precipitací polyethylenglykolem 6000 a gelovou permeační

chromatografii na sloupci Sephacrylu S300. Purifikovaný enzym byl částečně charakterizován. Jedná se o tetramer o celkové molekulové hmotnosti 240 000. Kinetika enzymové reakce katalyzované tímto enzymem odpovídá reakční kinetice Michaelise a Mentenové. pH optimum tohoto enzymu leží v oblasti pH 7,4–7,6. Ze spektrální analýzy plyne, že se jedná o flavinový enzym. Kvalita získaného enzymového preparátu byla potvrzena pomocí SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).

*Finančně podporováno GA ČR (grant 303/05/2195 a 104/04/0686) a MŠMT ČR (grant MSM 0021620808).*

### **MODIFIKACE ČÁSTIC MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU PRO JEJICH TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ**

**IRENA VORÁČKOVÁ, PAVEL ULBRICH,  
ŠIMON BEDNÁŘ a TOMÁŠ RUML**

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

V poslední době vzrůstá počet studií zabývajících se terapeutickým využitím modifikovaných virových částic. Jedná se především o dopravu terapeutických genů do specifických tkání nebo imunoterapie. Výhoda virových vektorů spočívá v jejich účinné infekci buněk a ve velikosti nesené DNA či RNA.

Tato práce se zabývá modifikací částic připravených ze strukturních proteinů Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) a jejich následným využitím pro genové terapie či imunizaci. Již dříve byl v naší laboratoři vyvinut vysoce účinný *in vitro* systém tvorby viru podobných částic ze strukturního polyproteinu Gag M-PMV a jeho delečních mutantů. Tohoto systému bylo využito při přípravě modifikovaných částic. Modifikace povrchu částic spočívala v *N*-koncovém prodloužení strukturního proteinu specifickým peptidem, který by částice složené *in vitro* cílil do určitých typů buněk. Pro směrování částic do specifických tkání byly vybrány peptidy, které interagují s rakovinnými buňkami prostaty a s endoteliálními buňkami. K imunoterapiím byl vybrán peptid, který je součástí membránového antigenu buněk prostaty (PSMA). Částice modifikované tímto peptidem je možné využít k imunizaci proti rakovině prostaty.

V obou případech se nám podařilo připravit modifikované částice. Schopnost peptidů cílit částice do recipientních buněk, vstup částic do buňky a uvolnění neseného terapeutického genu bude sledována na tkáňových kulturách. Imunizace připravenými částicemi bude testována na myším modelu.



**SIGMA-ALDRICH**

## SEZNAM AUTORŮ

|                        |          |                      |                         |
|------------------------|----------|----------------------|-------------------------|
| Adam, Jan              | 427, 458 | Holada, Karel        | 430, 437                |
| Adam, Vojtěch          | 437      | Holý, Antonín        | 454                     |
| Anzenbacher Jr., Pavel | 454      | Holý, Petr           | 455, 456                |
| Arlt, Volker M.        | 460      | Hortíková, Zdena     | 440                     |
| Badal, Vinay           | 440      | Horváth, Viktor      | 450                     |
| Baldus, Stephan        | 446      | Hošek, Jan           | 438                     |
| Bartl, Tomáš           | 427      | Hroudová, Miluše     | 439                     |
| Bartoš, Milan          | 438      | Hublarová, Pavla     | 440                     |
| Bartošová, Ladislava   | 438      | Chodounská, Hana     | 458                     |
| Bašová, P.             | 428      | Chrastilová, Zuzana  | 440                     |
| Bednář, Šimon          | 463      | Imberty, Anne        | 427, 458                |
| Beier, Petr            | 428      | Imramovský, A.       | 434                     |
| Beklová, Miroslava     | 437      | Jágr, Michal         | 441                     |
| Bělohradský, Martin    | 433, 456 | Jahodář, Luděk       | 443                     |
| Beneš, Luděk           | 427      | Janderka, Pavel      | 436                     |
| Bezouška, K.           | 428      | Jandurová, Zuzana    | 441                     |
| Bílková, Zuzana        | 442      | Jankovičová, Barbora | 442                     |
| Bišová, Kateřina       | 428      | Jesenská, Andrea     | 445                     |
| Bohatcová, Irena       | 429      | Jiráček, Jiří        | 450                     |
| Bouchal, Pavel         | 430      | Jiříkovská, Renata   | 427                     |
| Broučková, Adéla       | 430      | Jurček, Ondřej       | 442                     |
| Brožková, Kristýna     | 430      | Kalbáčová, Marie     | 448                     |
| Březinová, Lenka       | 429      | Karličková, Jana     | 443                     |
| Budka, Jan             | 447      | Kilsá, Kristine      | 455, 456                |
| Buchta, Vladimír       | 443      | Kizek, René          | 437, 460                |
| Burketová, Lenka       | 444      | Kleckerová, Andrea   | 460                     |
| Buřičová, Lucie        | 431      | Kniežo, Ladislav     | 452                     |
| Ciencialová, Alice     | 450      | Knížetová, Petra     | 444                     |
| Císařová, Ivana        | 433, 448 | Knoflíčková, Dana    | 430                     |
| Cvek, Boris            | 432      | Koča, Jaroslav       | 427                     |
| Čejková, Darina        | 431      | Kochánková, Lucie    | 449                     |
| Čejková, Pavlína       | 432      | Kolář, Zdeněk        | 444                     |
| Černá, Marie           | 432      | Kolorz, Michal       | 438                     |
| Damborský, Jiří        | 445      | Konopka, Roman       | 444, 451                |
| Dekoj, Václav          | 433      | Kopská, Tereza       | 435                     |
| Dostál, Ctibor         | 432      | Korbelová, Barbora   | 444                     |
| Dračínský, Martin      | 433      | Kostlánová, Nikola   | 458                     |
| Drašar, Pavel          | 442, 456 | Koudeláková, Táňa    | 445                     |
| Dvořák, Zdeněk         | 432      | Kovář, Jan           | 435                     |
| Eilbracht, Peter       | 445      | Kozubík, Alois       | 450                     |
| Eiserich, Jason P.     | 446      | Král, Vladimír       | 456                     |
| Férriz, J. M.          | 434      | Královský, Josef     | 442                     |
| Fojtíková, Lucie       | 442      | Krausová, Zuzana     | 445                     |
| Fojtíková, Markéta     | 432      | Krejčík, Zdeněk      | 438                     |
| Frančová, Kateřina     | 461      | Kremláčková, V.      | 446, 462                |
| Frébort, Ivo           | 454      | Křen, V.             | 428                     |
| Frýdlová, Zuzana       | 435      | Křenek, K.           | 428                     |
| Fürstová, Vlasta       | 435      | Kříž, Zdeněk         | 427                     |
| Gažák, R.              | 428      | Kubala, Lukáš        | 444, 446, 451           |
| Gernátová, Matilda     | 436      | Kubíková, Kateřina   | 443                     |
| Ghanbari, Hossein A.   | 451      | Kundrát, Ondřej      | 447                     |
| Glierová, Hana         | 437      | Langrová, Tereza     | 447                     |
| Grodecká, Lucie        | 445      | Lebowitz, Michael S. | 451                     |
| Grochová, Diana        | 461      | Lehocký, Marián      | 448                     |
| Hanuštiak, Pavel       | 437      | Levková, Monika      | 444                     |
| Havel, Ladislav        | 429, 460 | Lhoták, Pavel        | 447                     |
| Havlíček, Vladimír     | 459      | Lišková, Jana        | 448                     |
| Havlová, Marie         | 435      | Lojek, Antonín       | 444, 446, 450           |
| Hlavsová, Klára        | 438      | Loučka, Peter        | 438                     |
| Hlobilková, Alice      | 444      | Macek, Tomáš         | 440, 449, 450, 461      |
| Hodek, Petr            | 437, 452 | Macková, Martina     | 438, 440, 449, 450, 461 |



|                        |          |                      |          |
|------------------------|----------|----------------------|----------|
| Marek, Josef           | 432      | Stejskal, Karel      | 460      |
| Martásek, Pavel        | 456      | Stibor, Ivan         | 447      |
| Matějková, Petra       | 431      | Stiborová, M.        | 446, 462 |
| Mělková, Zora          | 448      | Stiborová, Marie     | 460      |
| Mikelová, Radka        | 437      | Stránský, Vladimír   | 441      |
| Miláčková, Ivana       | 427      | Streinz, Ludvík      | 462      |
| Míšek, Jiří            | 448      | Strnad, Hynek        | 438      |
| Mitchell, Edward       | 458      | Strouhal, Michal     | 431      |
| Mizerovská, Jana       | 460      | Svobodová, Jana      | 438      |
| Monincová, Marta       | 445      | Svobodová, Martina   | 460      |
| Mráz, Jaroslav         | 441      | Szekeres, Miklos     | 440      |
| Müller, Lukáš          | 432      | Šaman, David         | 445, 448 |
| Nagata, Yuji           | 445      | Šanda, Miloslav      | 461      |
| Najmanová, Jitka       | 449      | Šašek, Vladimír      | 444      |
| Navrátilová, Jarmila   | 450      | Šimák, Ondřej        | 456      |
| Nenutil, Rudolf        | 430, 440 | Škarpa, Petr         | 457      |
| Neubaerová, Tereza     | 450      | Šmajš, David         | 431      |
| Neuwirthová, Petra     | 451      | Šmarda, Jan          | 450      |
| Nielsen, Mogens B.     | 455, 456 | Šmardová, Jana       | 461      |
| Novák, Petr            | 452      | Šťastná, Eva         | 458      |
| Nováková, Martina      | 440      | Šulák, Ondřej        | 458      |
| Obšil, Tomáš           | 452      | Šulc, Miroslav       | 452, 459 |
| Okénková, Kateřina     | 451      | Šupálková, Veronika  | 460      |
| Otáhalová, Eva         | 451      | Taraba, Jan          | 432      |
| Páca Jr., J.           | 446      | Teplý, Filip         | 448      |
| Páca, J.               | 446, 462 | Tichý, Miloš         | 448      |
| Pačes, Václav          | 438      | Trešlová, Ludmila    | 432      |
| Pachernik, Jiří        | 444      | Turek, M.            | 446      |
| Panigaj, Martin        | 437      | Uhlík, Ondřej        | 461      |
| Parkan, Kamil          | 452      | Ulbrich, Pavel       | 463      |
| Pavliš, Oto            | 453      | Ulrichová, Jitka     | 432      |
| Pešlová, Kateřina      | 452, 459 | Umen, James G.       | 428      |
| Pohanka, Miroslav      | 453      | Valentová, Olga      | 444      |
| Pohl, Radek            | 454      | Vaňková, Jana        | 461      |
| Pokorná, Martina       | 427      | Vaňková, Radka       | 435      |
| Pomeisl, Karel         | 454      | Vávra, Jan           | 462      |
| Pospíšilová, Hana      | 454      | Vavříková, E.        | 434      |
| Prakash, G. K. Surya   | 428      | Vechetová, Eliška    | 438      |
| Prokop, Zbyněk         | 445      | Vilímková, L.        | 462      |
| Rambousková, Jaroslava | 427      | Vinšová, J.          | 434      |
| Rěblová, Zuzana        | 431      | Vlašínová, Helena    | 429      |
| Rösnerová, Šárka       | 442      | Vlček, Čestmír       | 438      |
| Rotter, Leopold        | 440      | Vojtěšek, Bořivoj    | 430, 440 |
| Rotterová, Pavla       | 440      | Voráčková, Irena     | 463      |
| Ruml, Tomáš            | 463      | Votruba, Ivan        | 454      |
| Rybáček, Jiří          | 455, 456 | Vrzal, Radim         | 432      |
| Rybáčková, Markéta     | 456      | Weinstock, George M. | 431      |
| Ryšánek, Dušan         | 447, 457 | Wilhelmová, Nad'a    | 435, 451 |
| Řeháková, Zuzana       | 443      | Wimmer, Zdeněk       | 442      |
| Sabin, Charles         | 427      | Wimmerová, Michaela  | 427, 458 |
| Sato, Yukari           | 445      | Zarevúcka, Marie     | 438      |
| Sehnal, Petr           | 445      | Závada, Jiří         | 455, 456 |
| Sejbal, Jan            | 433      | Zehnálek, Josef      | 460      |
| Senda, Toshiya         | 445      | Zeman, Ladislav      | 437      |
| Schroeder, Detlef      | 433      | Zibinsky, Mikhail    | 428      |
| Skládal, Petr          | 453      | Zobaniková, Marie    | 431      |
| Sládek, Zbyšek         | 447, 457 | Žabka, Martin        | 459      |
| Sláma, Petr            | 457      | Žádníková, Petra     | 427      |
| Slanina, Jiří          | 429      | Živný, Jan           | 437      |
| Sovová, Helena         | 438      |                      |          |
| Spišáková, Martina     | 448      |                      |          |
| Stará, Irena G.        | 445, 448 |                      |          |
| Starý, Ivo             | 445, 448 |                      |          |
| Stašková, Petra        | 427      |                      |          |

