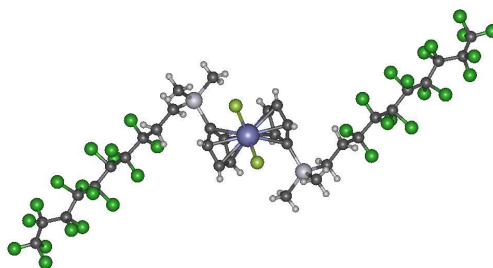




SIGMA-ALDRICH



V. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ

15. - 18. 6. 2005

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali

Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

V. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků

Pět let není mnoho, ale je to hodně tam, kde o něco jde. Pražská centrála firmy Sigma Aldrich je známa všem chemikům v zemi a slouží jim k jejich spokojenosti a k užitku věci. Slouží jim nicméně nejen jako obchodník; pracovníci firmy učí, přednáší, píšou odborné články atd. atd., a co víc, již pět let organizují setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků pracovně zvané „Amerika“, podle prvního místa konání, hotelu nedaleko Velkého Meziříčí.

Amerika se za pět svých pokračování stala prestižním setkáním toho nejlepšího, co mohou kolegové z nejmladší úspěšné skupiny přírodovědců nabídnout. Stala se prestižní kvůli výběru účastníků, kvůli úsilí, které účastníci i organizátoři věnují uspořádání a průběhu akce ale i kvůli společenské reflexi.

Když mi před nedávnem na schůzi v Bruselu vážení kolegové ze západnějších krajín doporučovali, ať i u nás uspořádáme konferenci mladých chemiků, mohl jsem odpovědět, že takové pořádáme již téměř třicet let, že byly velmi úspěšné a že jim jejich konání mohou doporučit též. Když jsem ale doplnil, že pražská společnost Sigma Aldrich již pět let pořádá spolu s naší společností a ČSBMB takovou akci s výběrem účastníků z několikanásobku přihlášených, akce má sborník otištěný v „impaktovaném“ časopise a nejlepší účastníci jsou vybráni porotou a odměněni firmou ΣA grantem v, na místní poměry, kulatní výši, dalších doporučení ze strany zkušenějších kolegů jsem se už nedočkal.

Přeji v pátém ročníku účastníkům soutěže mnoho zdaru a všem zúčastněným mladým kolegům hodně úspěchů v jejich vědecké práci, která je zjevně jejich koníčkem. Těm, kteří mají ještě větší kuráž, chci doporučit, aby se přihlásili i do soutěže o cenu Alfreda Badera či Josefa Koštíře, prestižní ceny udělované ČSCH a ČSBMB.

*Pavel Drašar,
místopředseda České společnosti chemické*

NOVÝ ELEKTROCHEMICKÝ BIOSENZOR VAZBY PLATINOVÝCH CYTOSTATIK DO STRUKTURY DNA

VOJTĚCH ADAM^{a,b}, JITKA PETRLOVÁ^a, DAVID POTĚŠIL^{a,b}, PŘEMYSL LUBAL^b, JOSEF ZEHNÁLEK^a, BERND SURES^d a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie a ^cKatedra teoretické a fyzikální chemie, MU, PŘF, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^dUniv. Karlsruhe, Zool. Inst. Okol. Parasitol., Karlsruhe, D-76128, Německo

Ačkoliv je *cis*-platina (*cis*-diaminodichloroplatina(II)) úspěšně používána v chemoterapii rakovinových onemocnění více než-li 25 let, její biochemický mechanismus účinku je stále nejasný. Současným názorem popisujícím působení *cis*-platiny je, že léčivo cytotoxicky působí prostřednictvím vazby na jadernou DNA (vazba na guanin) a následně narušuje obvyklou transkripci anebo DNA replikační mechanismy. Nicméně před vstupem do buňky může být *cis*-platina vázána fosfolipidy a fosfatidylseriny, které se vyskytují v buněčné membráně. A navíc je v cytoplasmě buňky obsaženo mnoho potenciálních platinu vázajících látek zahrnujících RNA a síru obsahující biomolekuly jako je glutathion a metalothionein. Popsanými mechanismy se buňka brání před vstupem a účinky těžkých kovů, mezi něž patří i léčiva jako je platina. Terapeutická koncentrace léčiva je proto výrazně odlišná od aplikované dávky. V dnešní době je stále aktuálnější problémem uvolňování, akumulace a působení platiny, která se do životního prostředí dostává např. z katalyzátorů používaných v automobilech, na živé systémy. Z těchto důvodů se mnoho vědeckých pracovišť zabývá jak studiem vazby *cis*-platinových protirakovinových léčiv do DNA, tak studiem vlivu samotné platiny na organismy. Nedávno bylo publikováno několik prací popisujících stanovení těžkých kovů pomocí biosenzorů založených na interakci těžkého kovu s DNA, enzymem, bakterií a proteinem. Cílem této práce bylo navrhnout platinový biosenzor založený na interakci kovu s metalothioneinem (MT) modifikovanou rtuťovou kapkovou elektrodou. Navržený biosenzor byl aplikován pro detekci platiny v lidském krevní sérum a pro studium interakce DNA s cytostatiky založenými na bázi platiny. Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Platina byla detekována pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky (AdTS) v kombinaci s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Aplikovali jsme elektrodu modifikovanou MT pro stanovení *cis*-platiny v krevním séru. Do vzorků lidského krevního séra jsme přidali rozdílnou koncentraci *cis*-platiny (10, 20, 40, 80, 160, 350, 450, 530 a 650 μM). Signál odpovídající za vazbu platiny do struktury MT se s rostoucí koncentrací *cis*-platiny lineárně snižoval. Limit detekce *cis*-platiny navrženým biosenzorem se pohyboval kolem 2,5 μM . Námí navržený postup ukazuje možnou cestu pro snadnou, senzitivní a rychlou detekci léčiva v tělních tekutinách na pikomolové úrovni (10 pmolů v 5 μl kapce). Dále jsme využili námí navržený platinový biosenzor pro studium vazby *cis*-platiny do DNA. Detekční limit pro Pt-DNA komplex byl 312,5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Navržený platinový biosenzor je využitelný pro

studium účinku platinových cytostatik na živé systémy. Sledování skutečné, terapeutické hladiny protirakovinového léčiva pomocí platinového biosenzoru může zvýšit účinnost léčby.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GAČR 525/04/P132 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Wu C.-M., Lin L.-Y.: *Biosen. Bioelectron.* 20, 864 (2004).
2. Palecek E.: *Anal. Biochem.* 170, 421 (1988).
3. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).

ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE GENERATES THE COVALENT DNA-ADDUCTS IN RATS *IN VIVO*

DAGMAR AIMOVÁ^a, EVA FREI^b, and MARIE STIBOROVÁ^a

^aDepartment of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague2; ^bDepartment of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg, BRD

Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and/or inhibition of topoisomerase II. Recently, we found that ellipticine also forms covalent DNA adducts *in vitro* and *in vivo* and that the formation of the major adduct is dependent on the activation of ellipticine by cytochromes P450 (CYP)¹⁻⁴. Here, we investigated the details of formation of ellipticine-derived DNA adducts *in vivo*.

Male and female Wistar rats were treated with different doses of ellipticine (0.4, 4.0, 40.0, and 80.0 mg ellipticine per kg of body weight) and DNA from various organs was analyzed by ³²P-postlabeling. Ellipticine-specific DNA adduct patterns, similar to those found *in vitro*, were detected in most test organs (liver, kidney, lung, spleen, heart and brain), being concentration-dependent. Only DNA of testes was free of the ellipticine-DNA adducts. The highest level of DNA adducts was found in liver, followed by spleen, lung, kidney, heart and brain.

One major and one minor ellipticine-DNA adducts were found in DNA of all these organs of both genders of rats exposed to ellipticine. Besides these, two or three additional adducts were detected in DNA of liver, kidney, lung and heart. Two predominant adducts formed in rat tissues *in vivo* were identical to the deoxyguanosine adduct generated in DNA by two ellipticine metabolites formed by CYPs, 13-hydroxy-ellipticine and the *N*²-oxide of ellipticine, *in vitro* as shown by cochromatography in two independent systems. Correlation studies showed that the formation of the major DNA adduct *in vivo* (adduct generated by 13-hydroxyellipticine) is mediated by CYP3A1- and CYP1A-dependent reactions. The adducts generated by ellipticine in all rat tissues analyzed in the study are not persistent adducts. Bi-phase kinetics of their repairing was found in rat tissues tested in our work.

The results presented here are the first report showing the dose-dependent formation of CYP-mediated covalent DNA adducts by ellipticine *in vivo* and studying their persistence in the rat animal experimental model.

Supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM0021620808).

REFERENCES

1. Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1675 (2001).
2. Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 38 (2003).
3. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int. J. Cancer* **107**, 885 (2003).
4. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* **64**, 8374 (2004).

STUDIUM STEREOSELEKTIVNÍHO PRŮBĚHU [2+2+2] CYKLOIZOMERACE TRIYŇŮ A JEJÍ VYUŽITÍ V SYNTÉZE HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH ALKOHOLŮ V NERACEMICKÉ FORMĚ

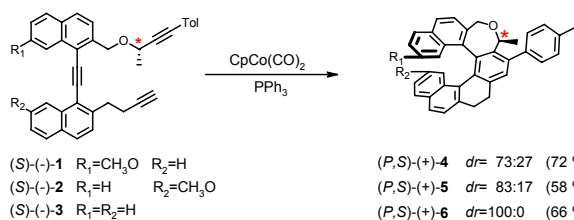
ZUZANA ALEXANDROVÁ, PETR SEHNAL, IRENA G. STARÁ, IVO STARÝ a DAVID ŠAMAN

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

V nedávné době jsme vyvinuli originální přístup k neracemickým derivátům helicenů¹, který je založen na stereoselektivní kobaltem(I) katalyzované [2+2+2] cykloisomerizaci aromatických triyňů obsahujících asymetrický atom uhlíku. Tento postup vedl k derivátům helicenů v diastereomerním poměru až 100:0 a helicity produktů byla předvídatelná ve všech studovaných případech².

Stereoselektivní [2+2+2] cykloisomerizaci triyňů jsme využili pro přípravu funkcionalizovaných derivátů [7]helicenu v neracemické formě. Soustředili jsme se na studium stereoselektivity cyklizace chirálních triyňů (S)-(-)-1 a (S)-(-)-2. Ukázalo se, že v obou případech vzniká očekávaný pravotočivý diastereomer (P,S)-(+)-4 resp. (P,S)-(+)-5, avšak poměr diastereomerů je horší než v případě cyklizace nefunkcionalizovaného triyňu (S)-(-)-3, kdy vzniká jediný diastereomer (P,S)-(+)-6 (cit.²).

V současné době jsou studovány strukturální modifikace s cílem zvýšit diastereoselektivitu cyklizace substituovaných triyňů. Ověřujeme také možnost získání opticky čistých produktů pomocí krystalizace. Otázka vlivu kinetických a termodynamických faktorů na sterický průběh reakce je předmětem dalšího výzkumu. Získané neracemické helikální alkoholy budou využity jako prekursori chirálních ligandů pro enantioselektivní katalýzu a pro konstrukci ethynyl-helicenových oligomerů.



Podporováno GAČR (reg. č. 203/02/0248) a ÚOCHB AV ČR (výzkumný projekt č. Z4 055 905).

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., Buděšinský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* **7**, v tisku (2005).

IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DEGRADUJÍCÍCH PCB PO PŘÍMÉ IZOLACI DNA Z KONTAMINOVANÉ PŮDY

KATARINA BERANOVÁ, MARTINA MACKOVÁ a EDITA RYŠLAVÁ

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6

Životní prostředí bylo v minulých letech zatíženo zplodinami intenzivní průmyslové výroby. Do prostředí se tak dostalo mnoho cizorodých, těžko odbouratelných látek, mezi které patří i polychlorované bifenylly (PCB). Pro rekontaminaci ploch se obecně používají především fyzikálně-chemické metody, ale bylo zjištěno, že řada biologických systémů přispívá svému metabolismem novým podmínkám a spolu s detoxifikací dochází k degradaci polutantů. V současné době je pozornost věnována především mikroorganismům a rostlinám. Mohou působit společně, přičemž se využívá jejich vzájemných interakcí a spolupráce. Biologické systémy a jejich konsorcia, vzájemné vztahy a podíl na detoxifikaci prostředí představují možnost využitelnou jako přirozené alternativní způsob dekontaminace prostředí.

Cílem této práce bylo studium vztahů mikroorganismus-rostlina v půdě kontaminované PCB a vliv přítomnosti biologických systémů na degradaci PCB. Byl proveden pokus se třemi rostlinnými druhy (tabák viržinský, lilek černý a vojtěška setá), kterými byla osázena půda kontaminovaná PCB po dobu pěti měsíců. Jednou ze součástí charakterizace systémů je izolace a identifikace přítomných bakterií. V našem případě byl klasický způsob izolace bakterií kultivační metodou doplněn i izolací celkové mikrobiální DNA. Pro její izolaci byly navrženy tři metody, a to izolace DNA pomocí komerční soupravy firmy Mo Bio Laboratories (UltraClean Soil DNA Kit), fenol-chloroformová extrakce DNA z půdy a alternativní metoda, která zahrnuje izolační krok společný s fenol-chloroformovou extrakcí a purifikační krok, který byl prováděn na kolonkách komerční soupravy UltraClean Soil DNA Kit. Alternativní metoda izolace DNA z půdy byla

navržená pro zajištění většího množství vstupní půdy pro izolaci a tím většího výtěžku mikrobiální DNA.

Pro porovnání účinnosti metod byla měřena koncentrace DNA v daných vzorcích a vzhledem k malým výtěžkům DNA z izolačních postupů byl prováděn postup nested PCR, kdy byl amplifikován úsek genu *16S rDNA*, který je obecně sledován jako ukazatel mikrobiální diversity a kóduje malou podjednotku malé ribosomální podjednotky. Pro amplifikaci jeho úseku byly použity dvě sady primerů převzaté z literatury (F27 a R1492, F338GC a R518). Nejlépe se osvědčila metoda alternativní extrakce DNA z půdy, kdy po první amplifikaci nested PCR delšího úseku genu *16S rDNA* a následně elektroforéze byly získány viditelné bandy. Po amplifikaci vnitřního úseku části genu *16S rDNA* byly získány produkty PCR u všech vzorků.

V dalším kroku byla metoda izolace DNA z půdy použita pro identifikaci bakterií schopných degradovat PCB. V laboratorních podmínkách byla navržena metoda detekce přítomnosti genu *bphA1*, jež kóduje podjednotku bifenyloxygenasy, která je zodpovědná za konečné vnesení dvou molekul kyslíku do molekuly PCB při jejich degradaci a vykazuje značnou homologii u bakteriálních kmenů s potvrzenou schopností degradace PCB. Pro jeho amplifikaci (tedy sledování přítomnosti kmenů s možnou degradační schopností) byly navrženy dvě sady primerů (F350 a R1165, F463 a R674) pro postup nested PCR. Tímto postupem se podařilo potvrdit přítomnost bakterií degradujících PCB.

Tato práce byla sponzorována grantem FRVŠ č. 1938/2005/G4.

IDENTIFICATION OF CYTOKININ-RESPONSIVE PROTEINS IN *Arabidopsis thaliana* SEEDLINGS USING A PROTEOMIC APPROACH

GABRIELA BŮHMOVÁ, HANA KONEČNÁ, ZBYNĚK ZDRÁHAL, ŠÁRKA KOUKALOVÁ, and BŘETISLAV BRZOBOHATÝ

Department of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Cytokinins are plant hormones that influence a large variety of developmental and physiological processes in plants. Transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing bacterial isopentenyl transferase gene (*ipt*) coupled with a dexamethasone inducible system were used to investigate their function. IPT is a key enzyme in the biosynthetic pathway of cytokinins and its overexpression results in an increase in endogenous cytokinin levels.

Activation with dexamethasone resulted in an increased expression of *ipt* and a subsequent increase in endogenous cytokinin levels. Comparative proteomic analysis between *ipt*-activated and non-activated seedlings to characterize cytokinin-associated proteins was performed. Total protein extracts were separated at high resolution using 2D-PAGE technique on a broad pH gradient 3-10NL. Sensitive SYPRO Ruby fluorescent staining was used for protein visualization. Consequent image analysis could detect approximately 900

spots in each gel. Student T-test was applied on these datasets to select statistically valid spots for quantitative comparison.

Differential expression studies revealed the presence of several proteins showing significant qualitative and quantitative changes. After in-gel trypsin digestion, the proteins of interest were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

Obtained data support the concept that cluster analysis might be used as a valuable descriptive and predictive tool in proteomic research to identify classes of polypeptides potentially implicated in specific cellular functions. The relevance of our protein candidates in cytokinin signalling pathways will be determined in subsequent experiments.

O STABILIZOVANEJ NESTABILITE ANEB *IN VITRO* EVOLÚCIA TELOMERÁZOVO-DEFICIENTNÝCH KULTÚR ARABIDOPSIS

PETRA BULÁNKOVÁ, JIŘÍ ŠIROKÝ a BORIS VYSKOT

*Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav, Akademie věd ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
63868@mail.muni.cz*

Zachovanie integrity a stability genómu má pro všetky organizmy životne dôležitý význam. Teloméry sú fyzické konce eukaryotických chromozómov. Sú to nukleoproteínové komplexy, ktoré odlišujú konce chromozómov od neopravených dvojlákových zlomov a slúžia ako matrica pre ich kompletnú replikáciu. Čím sú tiež jednou z nevyhnutných podmienok stability genómu. U väčšiny druhov predlžuje telomerické sekvencie enzým telomeráza s aktivitou reverznej transkriptázy.

Mutácie telomerázy spôsobujú skracovanie telomér, ktoré napomoh obmedzuje rozmnožovaciu kapacitu bunky. U živočíchov najčastejšie nasleduje zastavenie bunkového cyklu, starnutie a apoptóza buniek. Deficiencia telomerázy u modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* mala za následok postupnú stratu telomerických sekvencií, rozsiahle genómové prestavby od piatej generácie (G5) a po desiatich generáciach stratu fertility spôsobenú vývojovými defektami¹. Rozsah siestach generácií medzi prvým objavením defektov mitóze v G5 a úplným zastavením vývoja v generácii G10 naznačuje, že rastliny na rozdiel od živočíchov nezastavujú bunkový cyklus napriek značným cytogenetickým aberáciami².

Z ôsmej generácie telomerázovo deficientných rastlín (G8 *tert*-/-) boli postupne odvodené dve línie kalusových kultúr. Obe *in vitro* kultúry sú schopné prežívať a proliferovať dlho potom, čo pôvodné rastliny stratili svoju proliferačnú kapacitu. Cytogenetická analýza s využitím merania obsahu DNA na určenie ploidie a viacfarebnej *in situ* hybridizácie s centromerickými, rDNA a telomerickými sondami naznačuje, že každá z kultúr si vytvorila vlastnú stratégiu na prežitie s nechránenými koncami chromozómov. Je možné zhrnúť, že nefunkčnosť telomér vedie k rozsiahlym prestavbám genómu, ktoré sú však u rastlín, na rozdiel od živočíchov, tolerované.

Práce bola podporená grantom: GAČR 522/03/0354.

LITERATURA

1. Říha K., McKnight T.D., Griffing L.R., Shippen D.E.: *Science* 291, 1797 (2001).
2. Široký J., Zluvova J., Říha K., Shippen D.E., Vyskot B.: *Chromosoma* 112, 116 (2003).

DLOUHODOBÝ VÝVOJ KOLONIÍ KVASINKY *Saccharomyces cerevisiae*

MICHAL ČÁP a ZDENA PALKOVÁ

*Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká Fakulta
Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2*

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které při růstu na pevném médiu tvoří mnohobuněčné útvary – kolonie. Existuje mnoho pozorování, které poukazují na to, že kolonie nejsou pouhým náhodným shlukem buněk, ale že v rámci kolonie dochází k různým regulacím a signalizacím, které mají za následek například rozdílnou expresi některých genů v různých částech kolonie nebo prostorovou strukturovanost kolonií některých kvasinkových kmenů. V kolonii se nachází mnoho mikroprostředí lišících se svými podmínkami a jsou obývány různými subpopulacemi buněk. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je klasickým molekulárně biologickým modelovým organismem, její studium však probíhá převážně v tekutých kulturách v médiích s dostatkem živin. S takovými podmínkami se však kvasinka v přirozeném prostředí setká jen málokdy. Studium dlouhodobého vývoje kvasinkových kolonií je bližší stavu, ve kterém se kvasinky nacházejí v přírodě a pomohou nám pochopit principy strukturalizace kolonií, buněčné diferenciaci, hladovění a dlouhodobého přežívání mikroorganismů v přirozených podmínkách.

V naší laboratoři bylo objeveno, že kvasinkové kolonie mezi sebou dokáží komunikovat na velkou vzdálenost pomocí plynného amoniaku. Amoniak je produkován buňkami kolonie v určité fázi vývoje a okolní kolonie dokáží tento signál detekovat a odpovědět na něj vlastní produkcí amoniaku. Tak je signál amplifikován a předáván dál. Produkce amoniaku probíhá v pulzech a je doprovázena alkalisací média. V důsledku přijetí amoniakového signálu dojde v buňkách kolonie k mnoha změnám. Tyto změny byly studovány sledováním transkriptomových změn metodou DNA čipů. V průběhu vývoje kolonie a amoniakové signalizace dochází ke změně exprese mnoha genů, v důsledku čehož dojde mimo jiné k přeprogramování metabolismu a k snížení exprese genů stresové odpovědi. Proto byla navržena hypotéza, že amoniakový signál je produkován hladovějícími a stresovanými buňkami, pomáhá koloniím adaptovat se na podmínky hladovění, přizpůsobit metabolismus snížit buněčný stres a je důležitý pro synchronizaci těchto procesů mezi celou populací kolonií. Ve své práci jsem se zaměřil na souvislost mezi amoniakovou signalizací a oxidativním stresem a na změny mitochondriální aktivity během vývoje kvasinkové kolonie.

Tato práce je podporována grantem GAČR 525-05-0297 a doktorským projektem GAČR 204/03/H066.

EXPRESSION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF BCRP (ABCG2) IN HUMAN CHORIOCARCINOMA BeWo CELL LINE

**MARTINA ČEČKOVÁ^a, ANTONÍN LIBRA^a,
KATEŘINA POSPÉCHOVÁ^a, MARIANNE BRABEC^b,
PETR PÁVEK^a, RENATE FUCHS^b,
and FRANTIŠEK ŠTAUD^a**

^a*Charles University Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec
Králové, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové,*

^b*Department of Pathophysiology, Medical University of
Vienna, Währinger Gürtel 18-20, Wien, Austria
ceckova@faf.cuni.cz*

The breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) is the latest member of ABC drug efflux membrane transporters. Similarly to P-glycoprotein (P-gp, MDR1), BCRP is distributed in epithelia involved in drug disposition, especially in the placenta, small intestine and liver. Since the trophoblast layer represents the key structure in transplacental drug transfer, in this study we evaluated BCRP expression and functional activity in human choriocarcinoma trophoblast-like BeWo cell line to assess its possible role in transplacental pharmacokinetics.

To detect BCRP in placenta and in BeWo cells on protein level, we employed Western Blotting using BXP-21 monoclonal antibody. Expression of BCRP on the mRNA level was evaluated and compared to the MDR1 expression by quantitative RT-PCR method using TaqMan Probes. For absolute quantification, cloned BCRP sequence and MDR1 sequence were used as a standard. Functional activity of BCRP in BeWo cells was studied by the uptake assay with 20 μM mitoxantrone as a BCRP and Pgp substrate. For inhibition studies, the following inhibitors were used: 5 μM GF120918, a common inhibitor of BCRP and P-gp, 1 μM Ko143, a specific inhibitor of BCRP and 1 μM PSC833, a specific inhibitor of P-gp. Mitoxantrone uptake by BeWo cells was detected by FACS analysis. The BCRP membrane expression in BeWo cells was further evaluated by immunofluorescence microscopy using BXP-21 antibody and cells cultured on coverslips. To evaluate localization of BCRP in human term placenta immunohistochemical method with BXP-21 antibody was employed.

Immunoblot analysis revealed BCRP as a 70 kD protein expressed in BeWo cells as well as in human term placenta. On the level of mRNA, quantitative RT-PCR method revealed expression of 6.3×10^6 transcripts of BCRP per μg RNA in BeWo cells, whereas there was no detectable expression of MDR1. In human term placenta we found $10.4 \pm 1.6 \times 10^5$ transcripts of BCRP per μg RNA and $1.2 \pm 0.4 \times 10^5$ transcripts of MDR per μg RNA. The functional study showed 2.3 fold increase in accumulation of mitoxantrone in the presence of GF120918 and 2.6 fold increase in the presence of Ko143 when compared to the non-inhibited control ($p < 0.01$). These results confirm the role of BCRP in extruding its substrates out of the trophoblast cell line. Furthermore, statistically significant 1.6 higher accumulation of mitoxantrone in the presence of P-gp inhibitor PSC833 ($p < 0.05$), confirms certain

activity of the P-gp transporter in BeWo cells. Employing immunofluorescence microscopy, BCRP transporter was found to be predominantly localized on the microvillous membrane of BeWo cell line. Immunohistochemical localization of BCRP in human term placenta revealed its exclusive expression in trophoblast cells, the layer believed to represent a barrier to transplacental drug transfer.

To conclude, here we present the expression and functional activity of membrane expressed BCRP transporter in BeWo cells was considerably higher than that of MDR1. Furthermore, concerning the expression of BCRP in human term placenta being notably higher compared to MDR1, we suggest that the role of BCRP in transplacental pharmacokinetics could be even more important, than that so far reported for MDR1.

Supported by the Project AKTION 38p17.

INTERAKCE ANTIEPILEPTIK S BCRP TRANSPORTÉREM *IN VITRO*

**LUKÁŠ ČERVENÝ^a, PETR PÁVEK^a,
JANA MALÁKOVÁ^b a FRANTIŠEK ŠTAUD^a**

^aKatedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta UK, ^bÚstav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice UK, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05 cerveny@faf.cuni.cz

Farmakorezistentní epilepsie je závažným klinickým problémem, který se vyskytuje u 30 % pacientů postižených epilepsií. Za jednu z příčin jejího vzniku je považována imunohistochemickými a molekulárně-genetickými metodami pozorovaná up-regulace ABC transportérů lokalizovaných v hematoencefalické bariéře (HEB). Up-regulované transportéry snižují účinnou koncentraci antiepileptika v mozku tím, že „pumpují“ své substráty zpět do krevního oběhu ve větší míře, než je tomu u zdravého mozku. Důležitými zástupci této rodiny transportérů v HEB jsou P-gp (P-glycoprotein), MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2) a BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). Další problematikou řešenou v kontextu s těmito transportéry je modulace jejich transportní aktivity léčiv.

V naší studii jsme se zaměřili na méně známý BCRP, který nebyl ve vztahu k farmakorezistentní epilepsii doposud zkoumán. Dále pak jsem studovali modulaci transportu BCRP antiepileptiky a to konkrétně inhibici. Práce byla rozdělena do dvou částí:

a) Transportní studie *in vitro*. Touto metodou jsme ověřovali, zda-li některé z vybraných antiepileptik (fenobarbital, fenytoin, ethosuximid, primidon, klonazepam, karbamazepin, kyselina valproová, lamotrigin) je substrátem BCRP. Tyto studie byly provedeny na zavedené buněčné linii MDCKII transfekované cDNA humánního BCRP. Pro pozorování transportní aktivity BCRP proteinu jsme využili metodu, která využívá mikroporózní membránové filtry. Koncentrace antiepileptika byla stanovována pomocí HPLC analýzy.

b) Akumulační studie *in vitro*. Tyto studie byly prováděny na buněčné linii MEF3.8 transfekované cDNA humánního BCRP pomocí známého fluorescenčním substrátu BCRP, BODIPY prazosinu FL.

Jak pro transportní tak i pro inhibiční studie byla použita koncentrace antiepileptik 25 μ M. Tato koncentrace je relativně blízká plazmatickým koncentracím antiepileptik. Výsledkem bylo zjištění, že žádné ze zkoumaných antiepileptik není substrátem BCRP a zároveň, že žádné z těchto antiepileptik, kromě klonazepamu, neinhibuje funkci BCRP proteinu. Klonazepam opakovaně mírně zvyšoval akumulaci BODIPY prazosinu FL v buňkách, což nasvědčuje jeho inhibičnímu vlivu na BCRP. Z těchto výsledků získaných *in vitro* metodami usuzujeme, že se BCRP pravděpodobně nepodílí na vzniku rezistence vůči antiepileptikům a také můžeme vyjádřit domněnku, že na úrovni hematoencefalické bariéry zřejmě nedochází k interakci testovaných antiepileptik s BCRP.

IZOLACE A CHARAKTERIZACE LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU Z LAREV MASAŘKY *Neobellieria bullata*

**ALICE CIENCIALOVÁ^{a,b}, JIŘÍ JIRÁČEK^a, MARTINA
MACKOVÁ^c a BOHUMÍR KOUTEK^a**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra biochemie PŘF UK, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, ^cKatedra biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6 ciencial@uochb.cas.cz

Světová zdravotnická organizace uvádí, že rezistence k antimikrobiálním látkám je závažný zdravotní problém¹. Stále dochází k nárůstu rezistence bakterií vůči současným antibiotikům (rezistence *Salmonella typhimurium* k tetracyklínům vzrostla z 0 % v roce 1948 k 98 % v roce 1998 cit.²). Každou hodinu zabijí bakteriální infekce na naší planetě 1500 lidí a z toho polovina jsou děti mladší pěti let. Tato zjištění vedou ke snaze najít nové účinné antimikrobiální látky, které by ničily mikroorganismy a přitom by se vůči nim obtížně vytvářela rezistence³.

Třída hmyzu se zdá být novým, slibným zdrojem přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. V posledních letech byly právě z rozličných druhů hmyzu izolovány peptidy, které vykazovaly zajímavou *in vitro* aktivitu proti mikroorganismům rezistentním ke konvenčním antibiotikům. Právě tyto peptidy by se mohly stát vzorem pro tvorbu nových terapeutických zbraní v boji s mikroorganismy⁴.

Jako modelový organismus používáme larvy masařky *Neobellieria bullata*, zástupce řádu diptera s dokonalou proměnou. Výhodou této masařky je možnost jejího kontinuálního chovu v laboratorních standardních podmínkách na rozkládajících se jácích. Larvy a také mouchy jsou vystaveny a odolávají širokému spektru mikroorganismů z prostředí ve kterém žijí a přežívají. Naším cílem je izolace a charakterizace nových antimikrobiálně aktivních látek, např. peptidů nebo proteinů, účastnících se imunitní odpovědi proti bakteriálním infekcím.

Výchozím materiálem pro izolaci je hemolymfa larev *Neobellieria bullata*, které ukončily období žíru a začaly období tzv. toulavého chování. V tomto období je první skupina larev injektována 1 μ l bakteriální suspenze a druhá skupina larev slouží jako negativní kontrola. Za 24 hod je z indukovaných a kontrolních larev izolována hemolymfa.

Z hemolymfy jsou v několika krocích izolovány jednotlivé frakce. Izolované frakce jsou dále podrobeny charakterizaci fyzikálně chemickými metodami: UV-VIS spektroskopii, aminokyselinovou analýzou, hmotnostní spektroskopii (MALDI), SDS elektroforézou, MS analýzou tryptického digestu a sekvenací. U všech izolovaných frakcí jsme testovali a porovnávali antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Escherichia coli* (zástupce G-negativních bakterií) a *Staphylococcus aureus* (zástupce G-pozitivních bakterií). Identifikovali jsme několik látek s významnou antibakteriální aktivitou.

Tato práce je podporována grantem GAČR 203/05/0832 a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

LITERATURA

1. Hancock R. E. W.: Lancet 349, 418 (1997).
2. Teuber M.: Cell. Mol. Life Sci. 56, 755 (1999).
3. Tan Y. T., Tillett D. J., McKay I. A.: Mol. Med. Today 6, 309 (2000).
4. Dimarcq J. L., Hunneyball I.: Drug Discov. Today 8, 107 (2003).

POROVNÁNÍ VLIVU POLYMERNÍ PŘÍSAKY NA VLASTNOSTI RŮZNÝCH DRUHŮ MALT

KATEŘINA DOUBRAVOVÁ

*Ústav chemické technologie restaurování památek, FCHT, VŠCHT, Technická 5, Praha 6
katerina.doubravova@vscht.cz*

V oblasti památkové péče se v poslední době prosazuje pravidlo, že na rekonstrukce historických památek je nutné používat tzv. původní materiály. Tímto materiálem je ve velké většině malta na bázi vápenného hydrátu, příp. s hydraulickými přísadami. V praxi jsou však k rekonstrukcím často používány směsi připravené přímo na stavbě s přísadkou cementu, případně polymerních disperzí. Směsi takto připravené nemají většinou vyzkoušené a předem známé vlastnosti. Vliv polymerních přísad na malty a betony z cementu je poměrně dobře znám. Vliv na vlastnosti vápenných malt není naopak téměř prostudován. Práce se proto zabývá porovnáním vlivu komerčně vyráběného polymerního redispersovatelného prášku na tři druhy malt (vápenná, vápenná s hydraulickou přísadou a cementová). Sleduje změny fyzikálně-mechanických vlastností zatvrdlé malty (pevnost v tlaku, pevnost v ohybu, nasákavost vodou za různého tlaku, odolnost mrazu a odolnost krystalizaci solí) v závislosti na obsahu polymerního redispersovatelného prášku a na druhu pojiva malty. Z výsledků vyplývá, že vliv polymerní přísady na pevnost v tlaku a pevnost v ohybu je výraznější u malt z vápenného hydrátu – částečně zřejmě

proto, že vápenné malty v tak krátké době (3 měsíce) nedosahují takových pevností jako malta cementová. Z tohoto pohledu je možné tento redispersovatelný prášek doporučit tam, kde je potřeba z technologických důvodů použít čisté vápennou maltu bez hydraulických přísad, ale s vyšší pevností (po krátké době) v porovnání s nemodifikovanou vápennou maltou. Ze stanovení odolnosti krystalizaci solí a mrazovému poškození vyplynulo, že tento druh polymerního redispersovatelného prášku oproti očekávání nezlepšuje odolnost vápenné malty. V takovém případě je pak na místě doporučení, aby se k modifikaci vápenné malty nepoužíval. Z uvedeného je navíc zřejmá důležitost dokonalé znalosti vlivu přísad na vlastnosti zatvrdlé malty ještě před tím, než je projekt realizován.

STUDIUM INTERAKCÍ MEZI DNA A INTERKALÁTORY POMOCÍ NMR TECHNIK

MARTIN DRAČÍNSKÝ a JAN SEJBAL

*Katedra organické chemie PČF UK, Albertov 6, 12843 Praha 2
martindraca@yahoo.com*

Jednou z možností, jak studovat interakce biomakromolekul, například DNA a proteinů, s malými molekulami (ligandy) je NMR spektroskopie¹. Použití technik NOESY umožňuje zjištění třidimenzionální struktury molekul v roztoku za fyziologických podmínek (pH, iontová síla)^{2,3}.

Většina protinádorových léčiv se vyznačuje vysokou afinitou k DNA, mnohá z nich (například elipticin^{4,5}) se vmezeňují mezi páry bazí DNA. Tyto látky se označují jako interkalátory.

V této práci byly studovány interakce derivátů elipticinu s krátkými duplexy oligonukleotidů. Duplexy obsahovaly osm párů deoxyribonukleotidů. Konkrétně byly studovány oligonukleotidy d(CGCTAGCG)₂ a d(ATAGCTAT)₂. Prvním úkolem bylo přiřazení všech ¹H NMR signálů oligonukleotidů. K tomuto účelu byla použita dvoudimenzionální spektra NOESY, TOCSY a DQF COSY. Spektra byla měřena jak v H₂O tak v D₂O. Měření v H₂O umožňuje sledovat i signály vodíků, které se rychle vyměňují s rozpouštědlem (amino a imino vodíky). Poté byly roztoky oligonukleotidů titrovány elipticinem a byly sledovány změny ¹H NMR spekter způsobené přidávkou interkalátoru. Přídavek elipticinu způsobuje změnu chemických posunů oligonukleotidů, změnu tvaru signálů a ve spektrech se objevují nové signály. Interpretací těchto změn bylo zjištěno, že elipticin tvoří s oligonukleotidy komplexy, jejichž střední doba života se pohybuje v řádu milisekund, geometrie komplexů odpovídá interkalaci. Dále byla zjištěna částečná selektivita elipticinu ke GC pářům a pravděpodobná orientace interkalovaného elipticinu.

LITERATURA

1. Feigon J., Denny W. A., Leupin W., Kearns D. R.: J. Med. Chem. 27, 450 (1984).
2. Fede A., Labhardt A., Bannwarth W., Leupin W.: Biochemistry 30, 11377 (1991).
3. Gao X., Patel D. J.: Biochemistry 28, 751 (1989).

4. Fosse P., Rene B., Charra M., Paoletti C., Saucier J.M.: *Mol. Pharm.* 42, 590 (1992).
5. Dračínský M., Castaño O.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 1799 (2004).

INHIBITION OF HER-2/PI3-K/AKT KINASE SIGNALING PROTECTS BREAST CANCER CELLS FROM TRAIL-INDUCED APOPTOSIS

LENKA DUBSKÁ^{a,b}, LADISLAV ANDĚRA^c, and MICHAEL SHEARD^d

^a*Department of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*, ^b*Department of Genetics and Molecular Biology, Masaryk University, Brno*, ^c*Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Science, Prague*, ^d*Division of Hematology-Oncology, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, USA*
dubska@mou.cz

Overexpression of the Her-2/neu receptor correlates with cancer cell proliferation, resistance to apoptosis, and poor survival of breast cancer patients. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in cancer cells and is involved in anti-tumor immune defense.

We investigated whether downregulation of Her-2 by the anti-Her-2 antibody trastuzumab could cooperate with TRAIL effector pathway in breast cancer cells. Her-2-overexpressing cells responded to trastuzumab with modest apoptosis, but unexpectedly, with decreased susceptibility to TRAIL. Moreover we found that main pathways downstream Her-2, MEK/MAPK and PI3-K/Akt kinase signaling, differ in regulation of TRAIL-induced apoptosis; as reported previously, inhibition of MEK/MAPK pathway promoted TRAIL-induced apoptosis.

On the other hand, specific inhibition of the PI3-K/Akt kinase pathway by LY-294002, resulted in a decrease in susceptibility to TRAIL that was associated with a reduction in caspase-8 activation, Bid processing, as well as a reduction in drop of mitochondrial membrane potential and PARP cleavage, analogous to treatment with trastuzumab. Investigating the effect of trastuzumab and PI3-K/Akt kinase inhibition on the expression of apoptosis-related proteins revealed reduced expression of TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5, consistent with reduced susceptibility to TRAIL. Her-2/PI3-K/Akt-suppressed cells also exhibited decreased level of anti-apoptotic protein Bcl-xL expression which likely contributes to the observed increase of mitomycin C-induced apoptosis in cells treated with trastuzumab and LY-294002. These data indicate that oncogene activation, in our case Her-2 overexpression and constitutive PI3-K/Akt kinase activity, might regulate the expression of TRAIL-receptors and consequently responsiveness to TRAIL, thereby playing proapoptotic role in certain cellular context. Likewise, downregulation of oncogenic Her-2/PI3-K/Akt signaling by trastuzumab leads to drop in TRAIL susceptibility.

PŘÍPRAVA TENKÝCH VRSTEV VELKÝCH ORGANICKÝCH MOLEKUL

RUDOLF FRYČEK

Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT v Praze, Technická 6, 166 28 Praha
frycekr@vscht.cz

Nová technologie přípravy tenkých organických vrstev byla vyvinuta z technologie využívající ablace materiálu po interakci s energetickým laserovým pulsem a následně depozici na blízký substrát. Tímto způsobem je možno nanášet mnoho anorganických materiálů, zatím co u organických sloučenin může být použito pouze stabilních výchozích látek.

Problém přípravy tenkých organických vrstev z molekul jako jsou aminokyseliny, proteiny, polysacharidy, enzymy, protilátky je možno vyřešit depozicí z matrice (MAPLE – *Matrix Assisted Pulse Laser Deposition*). Matrici tvoří rozpouštědlo s velkým absorpčním koeficientem na vlnové délce použitého laseru. Laser excituje přednostně matrici a vibračními přechody dojde k vybuzení přenášené látky a její „měkké“ desorpci a depozici na substrát. Výhoda proti jiným tenkovrstvým technologiím nanášení je snadná možnost regulace tloušťky od nanometrů až po několik mikrometrů a možnost tvorby vícevrstevých struktur bez ohrožení již nanášené vrstvy. Předpokládá se využití při přípravě potahovaných léčiv nebo léčiv s postupným uvolňováním, přípravě tenkých vrstev biologických látek pro usnadnění analýzy, depozici biokompatibilních materiálů nebo příprava aktivních vrstev pro chemické nebo biologické senzory.

První experimenty byly provedeny s komplexními sloučeninami acetylacetonátů, ftalocyaninů a porfyrinů kovů. Byly testovány vlastnosti vybraných matric a vhodnost jejich použití v systému s deponovanou látkou. Jako test úspěšného přenosu původní látky byla použita infračervená a Ramanova spektroskopie. Připravené vrstvy byly použity jako aktivní vrstvy senzorů pro vodivostní a optickou metodu detekce plynných složek atmosféry.

MONOLITICKÉ STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI AKRYLAMIDU PRO KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAPHII OLIGOSACHARIDŮ

VILÉM GURYČA^{a,b,c}, JIŘÍ MICHÁLEK^b, MILOŠ V. NOVOTNÝ^c a VĚRA PACÁKOVÁ^a

^a*Přírodovědecká fakulta UK, 128 40 Praha*, ^b*Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha*, ^c*Indiana University Bloomington, USA*

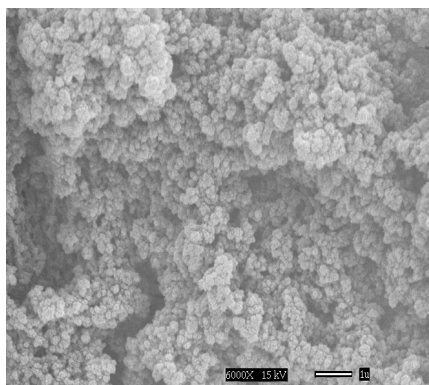
Snahy analytické glykobiologie určit cukerné struktury uvolněné enzymatickým štěpením z buněčných glykoproteinů vyžadují chromatografickou kolonu umožňující separace oligosacharidů z komplexních biologických materiálů s vysokou účinností, selektivitou a reprodukovatelností, zaručující kompatibilitu s MALDI/ESI-MSn detekčním systémem¹.

Pracovní skupina okolo Novotného vyvinula potenciální stacionární fázi pro kapilární elektrochromatografii (CEC),

kteřá dovoluje docílit retence polárních analytů na hydrofilním ligandu ukotveném v polymerní monolitické matici. Analýzy se prováděly v mobilních fázích acetonitril/mravenčan amonný, které jsou vhodné i pro spojení s MS aparaturou a zaručují vysoké účinnosti separací².

Předkládaný příspěvek dokumentuje další zdokonalení polymeračních technik kapilárních kolon, zvyšování reprodukovatelnosti jejich přípravy a definuje retenční mechanismy pro stanovené polární analyty. Jsou presentovány separační charakteristiky kopolymeru pro lineární i větvené oligosacharidy/glykany a posléze srovnávány s předcházejícími procedurami³. Porosita hustě síťovaného polymerního materiálu je velmi závislá na obsahu složek polymerační násady. Proto byla struktura monolitu detailně studována pomocí rtuťové intrusní porosimetrie a rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) – viz obr. 1.

Upravený akrylamidový kopolymer byl po optimalizaci porogenní směsi schopen rutinně separovat derivatizované isoformy *N*-glykanů s účinností nad 100 000 pater.m⁻¹.



Obr 1. SEM snímek monolitické stacionární fáze pro CEC separace isoforem glykanů, Složení: akrylamid/ piperazin-bis-akrylamid/ vinylsulfonová kyselina (13:19:1)

Poděkování patří National Institute of Health - USA; Indiana Genomic Initiative, Indiana University - USA; Nadace Josefa Hlávky ČR.; Fond mobility UK, ČR a Akademie věd ČR, projekt AVOZ 40500505 za finanční pomoc.

LITERATURA

1. Mechref Y., Novotny M.V.: Chem.Rev. 102, 321 (2002).
2. Que A.H., Novotny M.V.: Anal.Bioanal.Chem. 375, 599 (2003).
3. Que A.H., Novotny M.V.: Anal.Chem. 74, 5184 (2002).

APLIKACE TECHNOLOGIE CIPHERGEN V KLINICKÉ ONKOLOGII

ŠÁRKA HELÁNOVÁ, PAVLA ČEŠKOVÁ, ROSTISLAV VYZŮLA a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Nové a účinné metody z oblasti genomiky a proteomiky směřují aplikovaný výzkum k vývoji personalisované

medicíny, v níž farmakologická léčba bude cílena s ohledem na fyziologické a genetické pozadí u konkrétního pacienta. Technologie analýzy založené na proteinech představují důležitý doplněk DNA mikročipů u mnoha klinických i výzkumných aplikací, neboť hladiny proteinů často jen málo korelují s hladinami mRNA. Přitom hladiny proteinů jasněji vypovídají o jejich skutečné expresi v buňce. Technologie Ciphergen je založená na SELDI TOF-MS a její uspořádání by mělo umožnit rychlou a efektivní analýzu proteinových směsí. Proteiny selektivně interagují se specifickými chromatografickými sorbenty ukotvenými na povrchu čipu a následně jsou detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Selektce je založena na hydrofobní či hydrofilní interakci, iontové interakci (katex, anex) nebo interakci proteinů s ionty kovů imobilizovanými na chelatační sorbent. Dále je možno s využitím pre-aktivovaných povrchů čipů kovalentně navázat různé protilátky, receptory, proteiny, DNA, RNA a další molekuly a vytvořit tak vlastní specifické afinní povrchy.

Důležitým cílem klinické proteomiky je identifikovat proteiny, které by mohly být užitečné jako biomarkery a najít vztah mezi těmito markery a stádiem onemocnění. Diagnostický marker, nebo marker odpovědi na léčbu musí mít velkou prediktivní váhu a přednostně by měl být detekován v materiálu získaném neinvazivně (sérum, moč atd.). Technologie Ciphergen má všechny předpoklady pro účinné vyhledávání nových biomarkerů.

V naší práci využíváme tuto technologii pro hledání nových sérových biomarkerů u definovaných souborů pacientů a ke korelaci klinicky využívaných biomarkerů se stádiem nemoci. Daná technologie nám rovněž umožňuje sledování proteinových spekter u nádorových lyzátů, analýzu vazby proteinu na DNA a interakci protilátek s cílovými antigeny.

Tato práce byla podpořena 301/05/0416 GAČR a NR/8338-3 IGA MZ ČR.

MODULÁRNÍ SYNTÉZA STEROIDŮ S AROMATICKÝM A-KRUHEM

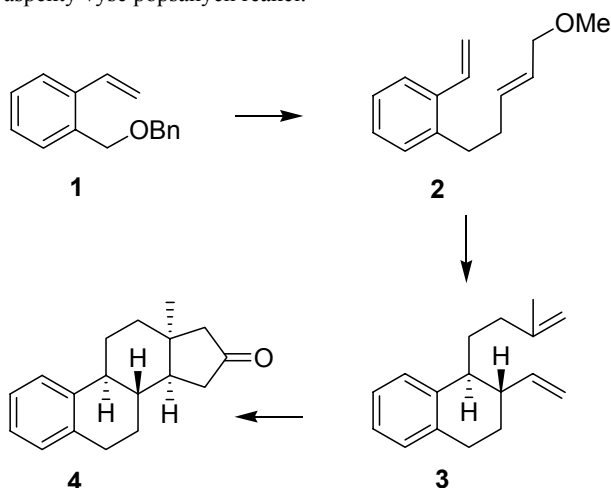
PAVEL HERRMANN^{a,b} a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aÚstav organické chemie a biochemie AVČR, Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6; ^bPřírodovědecká fakulta UK, Albertov 230, 128 43 Praha 2
pherrmann@uochb.cas.cz

Estron a od něj odvozené steroidy s aromatickým A-kruhem patří díky svým biologickým účinkům k častým cílům totální syntézy. Vzhledem ke své složité struktuře jeho syntéza slouží jako prubířský kámen pro testování nových syntetických metod.

Náš přístup je založen na následujících 3 postupných reakcích, které využívají pro tvorbu různých vazeb v každém kroku jedno činidlo - dibutylzirkonocen (Negishiho činidlo)¹. Jednotlivé kroky jsou založené na: *i*) oxidativní adici následované allylací, *ii*) cyklizaci 1-alkoxy-2,8-dienů následované opět allylací, a nakonec *iii*) karbonylativní cyklizací α,ω -dienu. Volba vhodného substrátu pro první reakci a použití různých allylhalogenidů (modulů) pro allylaci umožňuje cílenou funkcionalizaci skeletu.

Jako modelový substrát byl vybrán *o*-alkoxymethylstyren **1**, jež lze snadno připravit ve 2 krocích. Jeho reakcí za výše uvedených podmínek byl získán methoxyderivát **2**. Jeho cyklizace a allylace v přítomnosti CuCl poskytla α,ω -dien **3**, který po karbonylativní cyklizaci³ poskytl estra-1,3,5(10)-trien-16-on **4**. Budou diskutovány syntetické a stereochemické aspekty výše popsaných reakcí.



LITERATURA

1. Ikeuchi Y., Taguchi T., Hanzawa Y.: *Tetrahedron Lett.* 45, 3717 (2004).
2. Kotora M., Umeda C., Ishida T., Takahashi T.: *Tetrahedron Lett.* 38, 8355 (1997).
3. Negishi E., in: *Comprehensive Organic Synthesis* (Trost, B. M.; Paquette L. A. ed.) Pergamon, 1991, Vol. 5, p. 1163.

HIGH EFFECTIVENESS OF PLATINUM(IV) COMPLEX WITH ADAMANTYLAMINE IN OVERCOMING RESISTANCE TO CISPLATIN AND SUPPRESSING PROLIFERATION OF OVARIAN CANCER CELLS *IN VITRO*

VIKTOR HORVÁTH^a, LENKA ŠVIHÁLKOVÁ ŠINDLEROVÁ^a, KAREL SOUČEK^a, OLGA BLANÁŘOVÁ^a, PETR SOVA^b, ALEŠ KROUTIL^b, FRANTIŠEK ŽÁK^b, ADOLF MISTR^b, JAROSLAV TURÁNEK^c, JIŘINA HOFMANOVÁ^a and ALOIS KOZUBÍK^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno, ^bPLIVA – Lachema a.s., Karásek 1, 621 33 Brno, ^cDepartment of Immunology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 32 Brno horvath@ibp.cz

[(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)], coded as LA-12, is a novel octahedral platinum(IV) complex containing a bulky hydrophobic ligand - adamantylamine. The use of bulky hydrophobic amines as a non-leaving ligands, may increase penetrability of the

compound to the cancer cells. Therefore, the effects of LA-12 on sensitive(A2780), with acquired resistance(A2780cis) and with intrinsic cisplatin resistance(SK-OV-3), ovarian cancer cell lines were investigated and compared to those of cisplatin. IC₅₀ and IC₉₀ concentrations of LA-12 were 6-(A2780) or 18-fold(A2780cis) lower than those for cisplatin(MTT assay). Equitoxic concentrations(IC₅₀ or IC₉₀) of both compounds caused a significant and similar time- and dose-dependent inhibition of cell proliferation and an increase in the number of floating cells which corresponded to the decrease of total cell viability. A different type and dynamics of cell cycle perturbation after cisplatin and LA-12 treatment were detected. Exposure to LA-12 resulted in transient accumulation of A2780 and A2780cis cells in S phase, while cisplatin caused G2/M arrest in sensitive and S phase arrest in resistant cells. A relatively low rate of apoptosis after exposure to IC50 or IC90 of both complexes was observed, markedly higher in resistant A2780cis cells. Western blot analysis indicated a concentration-dependent p53 level increase in both lines (higher after cisplatin treatment). PARP cleavage was observed only in A2780cis cells. In conclusion, LA-12 was found to be significantly more efficient than cisplatin, and it was able to overcome the acquired cisplatin resistance (showing resistance factor 2.84). In spite of the low rate of apoptosis, LA-12 caused increase of p53 level and cell cycle perturbations in the ovarian cancer cell lines studied.

Supported by the Grant Ministry of Education of the Czech Republic (FRVS grant no. 2528/2005) and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, Contract No. PZ-Z2/29, "New Medicines for Cancer Therapy".

REFERENCES

1. Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Žák F., Mistr A., Turánek J.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 373 (2005).

USING THE REAL TIME RT-PCR METHOD FOR THE CHARACTERIZATION OF THE AHP GENE FAMILY EXPRESSION PATTERN

JANA HRADILOVÁ^a a B. BRZOBOHATÝ^b

^aLaboratory of Plant Molecular Physiology, Masaryk University Brno, Faculty of Science, Kotlářská 2, 611 37, Brno, ^bInstitute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 61265 Brno

In this study we focus on the expression pattern of a family of AHP (*Arabidopsis* Histidine-phosphotransfer factors) genes in *Arabidopsis thaliana*. We also examined the influence of the plant-grow regulators cytokinins on AHP expression. AHPs are phosphotransfer shuttles in the multistep two-component system of signal transduction. AHPs transfer the phosphoryl group between membrane localised receptors (histidine kinases) and response regulators (transcription factors) localized in the nucleus. This system is thought to be involved in stress, cytokinin and ethylene signalling in

Arabidopsis. Cytokinins have been implicated in developmental and growth processes in plants including cell division, shoot meristem initiation, senescence and germination. They also have positive or negative influence on the expression of many groups of genes. Five AHPs have been identified until now in *Arabidopsis*. AHPs are small proteins (14.5–18 kDa), with a predicted acidic isoelectric point (5.5–3.9) and a typical phosphotransfer domain, including the conserved sequence XHQXKGSSXS with the histidine residue binding the phosphoryl group. Using real time RT-PCR we characterized the expression pattern of AHP genes in adult wild type *Arabidopsis thaliana* plants (ecotype Columbia 0). Different plant organs were tested – leaves, stems, roots, flowers and siliques. The influence of cytokinins on the level of AHPs expression was tested on 8 day-old seedlings tested with the cytokinin benzyladenine and also on 8 day-old seedlings overproducing endogenous cytokinins after dexamethasone treatment. We show that the highest mRNA level of AHP1 is in roots and highest level of AHP2 is in flowers, on the other hand there were no significant differences among tissues in expression patterns of AHP3 and AHP5 genes. AHP4 was expressed at very low levels in all tissues tested but the highest level was found in leaves. Also all of tested AHP genes have low expression in seedlings and siliques. A response to cytokinin was detected mainly for the genes AHP1 and AHP4, their steady-state mRNA levels going up. The expression of the genes AHP2 and AHP3 was also induced by cytokinins. Expression level of AHP5 remained unaffected by cytokinins. So, the AHP gene family can be divided into 3 subclasses. Subclass A - AHP1 and AHP4 (the gene expression is highly organ specific and highly induced by cytokinins), subclass B - AHP2 and AHP3 (no significant differences in gene expression among organs and moderately induced by cytokinins), subclass C - AHP5 (no significant differences in the gene expression among organs and no influence of cytokinins, alternative splicing was noted). Sequence homology also predicts similar pattern of subclasses.

Supported by grants LN00A081 and MSM143100008 (Ministry of Education of the Czech Republic).

PŘÍPRAVA CHIRÁLNÍCH SLOUČENIN ARYL-TETRAHYDROISOCHINOLINOVÉHO TYPU

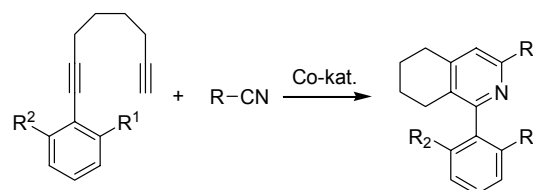
RADIM HRDINA a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 6, 128 43 Praha 2, ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
kotora@natur.cuni.cz, radimhrdina@email.cz

Chirální biarylové sloučeniny hrají klíčovou roli v enantioselektivní syntéze, především jako ligandy u reakcí katalyzovaných přechodnými kovy. V poslední době jsme svědky rozvoje tzv. „organické“ katalýzy, tj. katalýzy bez účasti kovu. Atropoizomerní biarylové sloučeniny s pyridinovým kruhem se zdají být vhodnými kandidáty pro

enantioselektivní syntézu¹. Jejich příprava je založena převážně na kaplinkových reakcích.

Naším cílem bylo vypracovat alternativní metodu vedoucí k různě substituovaným chirálním sloučeninám aryl-tetrahydroisochinolinového typu. Syntetická strategie byla založena na [2+2+2] cyklotrimerizaci 1-aryl-1,7-oktadiynů s nitrily. Reakce byly katalyzovány cyklopentadienovými komplexy kobaltu (CpCo(CO)₂, CpCo(cod), CpCo(=)₂) za standardních podmínek². Byla provedena celá řada cyklotrimerizačních reakcí diynů s různými substituenty R¹ a R² vedoucí k příslušně substituovaným tetrahydroisochinolinům v obstojných výtěžcích (schema 1). Ukázalo se, že průběh reakce závisí jak na sterických, tak na elektronických vlastnostech funkčních skupin R¹ a R².



R¹ = Me, OMe, COOMe, NHCOCH₃, atd.; R² = H, Me, aryl; R = Ph

Schéma 1

Práce byla podpořena grantem GA ČR 203/05/0102.

LITERATURA

- Malkov A.V., Dufková L., Farrugia L., Kočovský P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3674 (2003).
- Bönnemann H., Brijoux W.: *Adv. Het. Chem.* 48, 177 (1990).

VYUŽITÍ CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU KE STUDIU SEKUNDÁRNÍ STRUKTURY A KONFORMAČNÍHO CHOVÁNÍ PROTEINŮ

RADKA CHALOUPKOVÁ, ZBYNĚK PROKOP a JIŘÍ DAMBORSKÝ

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
jiri@chemi.muni.cz

Jedním z fyzikálních projevů chiralidy je optická aktivita, tj. schopnost chirálního objektu interagovat rozdílně s vlevo a vpravo kruhově polarizovaným elektromagnetickým zářením. Rozdílnost této interakce se projevuje v řadě chiroptických jevů, mezi které patří i cirkulární dichroismus. Cirkulární dichroismus je speciálním typem elektronové absorpční spektroskopie, která kvantifikuje schopnost opticky aktivního chromoforu rozdílně absorbovat vlevo a vpravo kruhově polarizované záření v závislosti na vlnové délce a v dnešní době se stále častěji využívá ke strukturálnímu studiu chirálních biomolekul.

Tato práce se zaměřuje na využití cirkulárního dichroismu (CD) ke studiu konformačního chování proteinů. Významnou aplikací této optické metody bylo stanovení sekundární struktury

enzymů, konkrétně halogenalkandehalogenas¹. Na základě naměřených CD spekter těchto enzymů bylo určeno procentuální zastoupení jednotlivých sekundárních elementů v jejich struktuře. Získané výsledky CD analýzy ukázaly velmi dobrou shodu ve srovnání s rentgenovou strukturální analýzou krystalů hodnocených proteinů.

CD spektroskopie byla dále využita pro porovnání struktury mutantních enzymů s původním divokým typem. Studovány byly sady mutantních enzymů halogenalkandehalogenasy LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (cit.²), elicitoru β -kryptogeinu z *Phytophthora cryptogea*³ a β -glukosidasy Zm-P60.1 ze *Zea mays*. Ověřením správného foldingu připravených mutantních enzymů bylo prokázáno, že případné změny v kinetickém chování enzymů nebyly způsobeny změnou jejich sekundární struktury. Podobným způsobem byla CD spektroskopie využita k strukturálnímu srovnání enzymu LinB produkovaného ve dvou různých expresních systémech (prokaryotický systém *E. coli* a eukaryotický systém *P. pastoris*)⁴. Z naměřených CD spekter bylo zjištěno, že sekundární struktura LinB je po získání z obou expresních systémů totožná.

Pro svou vysokou citlivost ke konformačním změnám byla CD spektroskopie dále využita ke studiu teplotní stability enzymů a jejich konformačního chování při různém pH. Vzájemně byla porovnávána teplotní stabilita enzymu LinB se dvěma nově izolovanými mykobakteriálními dehalogenasami DmbA a DmbB5. Teplotní stabilita těchto tří příbuzných enzymů je rozdílná, přičemž nejvyšší T_m teplota byla zjištěna pro enzym DmbB. Vliv pH na konformaci halogenalkandehalogenas byl studován pro tři enzymy: LinB, DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 a Dh1A z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. Při relativně velmi kyselých podmínkách (pH < 4) se všechny studované enzymy nacházely v konformaci odlišné od jejich nativní struktury, při pH blízkému pI těchto enzymů (pH ~ 5) byly nejméně rozpustné a při neutrálních a alkalických podmínkách (pH > 6,5) zaujímaly tyto enzymy konformaci, která odpovídá jejich nativní struktuře.

CD spektroskopie se ukázala být velmi vhodnou a užitečnou technikou ke studiu sekundární struktury a konformačních vlastností enzymů. V porovnání s NMR a RTG spektroskopii má výhodu rychlého získání dat s nízkými nároky na přípravu vzorků.

LITERATURA

1. Sato Y., Monincová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K., Tsuda M., Damborský J., Nagata Y.: Appl. Environ. Microbiol., přijato.
2. Chaloupková R., Sýkorová J., Prokop Z., Jesenská A., Monincová M., Pavlová M., Nagata Y., Damborský J.: J. Biol. Chem. 278, 52622 (2003).
3. Lochman J., Kasparovský T., Damborský J., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikeš V.: Biochemistry, odesláno.
4. Nakamura T., Zámocký M., Zdráhal Z., Chaloupková R., Monincová M., Nagata Y., Damborský J.: Prot. Expr. Purif., odesláno.
5. Jesenská A., Pavlová M., Strouhal M., Chaloupková R., Těšínská I., Monincová M., Prokop Z., Bartoš M., Pavlík I., Rychlík I., Möbius P., Nagata Y., Damborský J.: Appl. Environ. Microbiol., odesláno.

COMPARISON OF TWO KINETIC METHODS OF DETERMINATION OF THE ANTIRADICAL ACTIVITY USING 2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL

KATEŘINA CHVÁTALOVÁ and JIŘÍ SLANINA

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského nám. 2, 662 43 Brno
kchvatal@med.muni.cz

Considerable work has been directed towards developing relevant assay method for the evaluation of activity of free radical scavengers. A large number of methods using different approaches has been reported in the literature, but the simple spectrophotometric test based on scavenging of a stable coloured 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical belongs to the most commonly used. In the DPPH test, the scavenging ability of antioxidants is usually expressed as EC₅₀, the antioxidant concentration at which half of DPPH radicals is quenched in a predetermined time. This parameter (EC₅₀) does not reflect the reaction rate of antioxidants with DPPH.

The aim of this work was developing a kinetic method for the assessment of antiradical activity by virtue of determination of rate constants of DPPH scavenging. The rate constants and the order of reaction between DPPH and the antioxidant in methanol were estimated by the order degeneration method. If the concentrations of antioxidants were much higher than the concentration of DPPH, the rate constant of the reaction could not be determined due to nonlinear relationship between the rate constant of pseudo-first order and the concentration of antioxidants. However, the measurement at the excess of DPPH enables the assessment of the rate constants. Surprisingly, the decay of DPPH corresponds always to first-order reaction. For the majority of antioxidants, the rate of the decrease of DPPH depends only on the antioxidant concentration. However, for a small number of antioxidants, the rate of the reaction depends only on the DPPH concentration. We determined the rate constants of 25 antioxidants. Ascorbic acid was the most efficient scavenger of DPPH, which reacts with DPPH approximately million times faster than *para*-hydroxybenzoic acid, the weakest antioxidant. The relationship between the structure and the antiradical activity is reported. The antiradical activity of antioxidants depends not so much on the number of phenolic hydroxyl, as is reported in literature¹, as on the reactivity of the most activated hydroxyl. The first order rate constants can be used for the simple and correct statement of the antiradical activity.

REFERENCES

1. Bors W., Michel C., Stettmaier K.: Meth. Enzymol. 335, 166 (2001).

NEW MODIFICATION OF CURRENT TB DRUGS

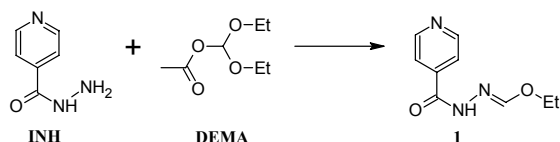
ALEŠ IMRAMOVSKÝ^a and SLOVENKO POLANČ^b

^aFaculty of Pharmacy Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^bFaculty of

Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Aškerčeva 5, SI 1000 Ljubljana, Slovenia
imramovsky@faf.cuni.cz

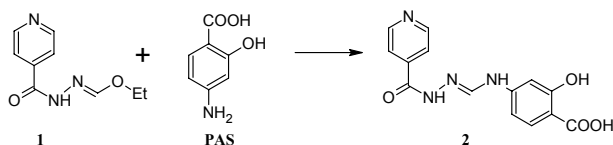
Isonicotinic acid hydrazide (Isoniazid, INH) is widely applied as a first-line drug for the treatment of tuberculosis (TB) and is usually employed in combination with other drugs (Rifampicine, Pyrazinamide, Ethambutol) for the treatment of an active disease. Isoniazid is also used for prevention of TB in people who have been exposed to the active disease but have no symptoms¹. In a simple molecule, such is isoniazid, it is difficult to efficiently modify the molecule in order to increase its biological activity. The same is true for most of other TB drugs. Herein, we propose a new approach to overcome this problem.

A simple method to modify various TB drugs was designed starting from the hydrazone **1** that is easily available from INH and diethoxymethyl acetate (DEMA)².



The ethoxy group of the compound **1** can be substituted with a number of nitrogen nucleophiles. If one of the TB drugs serves as a nucleophile, the product can be considered as a prodrug that contains two conventional drugs, connected by a CH fragment. Such products are expected to be stable in the solid state but they probably hydrolyze in aqueous solutions, in the presence of an acid or enzymatically, leading to both TB drugs or to one drug and the formylamino derivative of the other one.

To test the idea mentioned above, we performed the reaction of **1** and *p*-aminosalicylic acid (PAS). It is our pleasure to report that the reaction took place under mild reaction conditions to give the product **2** in 53% yield.



Two TB drugs can also be connected by a CH fragment if one of them is activated as the corresponding dimethylamino-methylene derivative. Several transformations to reach this goal are currently under active investigation.

Biological activity and hydrolytic stability of such modified drugs will also be discussed.

This work was supported by grant IGA MZ 1A/8238-3 and FRVŠ 297/2005/G6.

REFERENCES

1. <http://www.aegis.com/factshts/network/access/drugs/ison.html> - downloaded Jan 2005.
2. Košmrlj B., Koklič B., Polanc S.: Acta Chim. Slov. 43, 153 (1996).

MOLEKULÁRNÍ INTERAKCE KOLICINU U SE SVÝM IMUNITNÍM PROTEINEM

MAGDA JANALÍKOVÁ a DAVID ŠMAJS

Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Tomešova 12, 602 00 Brno
dsmajs@med.muni.cz

Koliciny jsou antibakteriální exoproteiny, jejichž geny jsou obvykle lokalizovány na plazmidech a které jsou produkovány bakteriálními kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae* (zejména druhem *Escherichia coli*). Toxický účinek, zajišťovaný C-koncovou doménou, je omezen na citlivé kmeny této čeledi a nejčastěji je nasměrován proti druhům příbuzným druhu produkčnímu. Proti letálnímu efektu syntetizovaného kolicinu se produkční kmen brání tvorbou tzv. imunitního proteinu, jehož gen je součástí kolicinogenního plazmidu. Interakce mezi volně rozpustným kolicinem a membránově vázaným imunitním proteinem je vhodným modelem pro studium protein-proteinových interakcí. Vybrali jsme si dvojici kolicinů U a Y, mezi nimiž je 87 % totožnost na úrovni aminokyselinové sekvence a přesto jejich producenti nejsou navzájem zkříženě imunní. Podstatou této studie bylo mutovat aminokyseliny kolicinu U (Y) ve smyslu sekvence kolicinu Y (U), sledovat změny v interakci mutovaných kolicinů s imunitním proteinem a určit interakční aminokyseliny kolicinu U a Y. V letální doméně je mezi kolicinem U a Y rozdílných 34 aminokyselinových zbytků, z nichž 21 leží v hydrofobní oblasti, která je nejpravděpodobnějším místem interakce s imunitním proteinem. Cílenou mutagenézou jsme mutovali všechny rozdílné aminokyseliny v hydrofobní a přilehlé oblasti a připravili tak více než 30 mutantních kolicinů. Zkoumali jsme jejich letální účinek na buňky transformované plazmidem nesoucí gen pro imunitní protein kolicinu U a kolicinu Y. Koliciny s většinou bodových mutací byly rozpoznávány imunitními proteiny stejně jako původní koliciny. Koliciny s bodovými mutacemi G580V a F576Y byly významně méně rozpoznávány a prokázaly jednoznačný význam aminokyselinových zbytků G580 a F576 pro interakci kolicinu U s imunitním proteinem kolicinu U. Slabé interakční místo, aminokyselinový zbytek N605, leží mimo hydrofobní oblast. Podobně je tomu i u kolicinu Y, kde všechny interakční aminokyseliny leží v hydrofobní oblasti a jejich poloha se částečně překrývá s polohou významných aminokyselin kolicinu U. Na základě porovnání identifikovaných aminokyselinových zbytků v polohách odpovídajících interakčním místům u kolicinu U a Y se sekvencemi dalších blízkých příbuzných kolicinů A, S4, L, N a B bylo zjištěno, že k efektivní interakci mezi kolicinem a imunitním proteinem dochází pouze pokud jsou přítomny více než dvě interakční aminokyseliny. Výsledky ukazují, že interakční místa příbuzných kolicinů s jejich imunitními proteiny nejsou totožná, ale navzájem se překrývají. Překryv interakčních míst pomáhá vysvětlit postupnou evoluci nových typů kolicinů depolarizujících plazmatickou membránu.

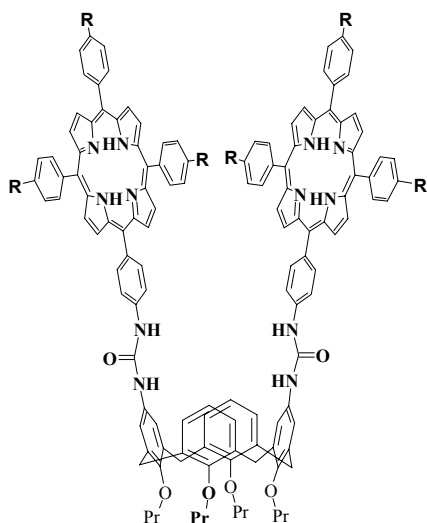
Tato práce byla sponzorována grantem: GAČR 310/03/1091.

VLIV SUBSTITUCE CALIXARENOPORFYRINŮ NA KOMPLEXACI FULLERENŮ

MARTIN KÁŠ, PAVEL LHOTÁK a IVAN STIBOR

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

Vzhledem k předpokládané průmyslové výrobě fullerenu a narůstajícímu množství jejich možných aplikací v různých oblastech – biofarmaceutika, kosmetika, speciální polymery, elektronika – je věnován značný zájem studiu jejich interakcí, důležitých například pro dělení jejich směsí. Poměrně dlouhou dobu je známa schopnost fullerenu interagovat s různými π -systémy, mezi které patří i porfyriny. V minulosti proto byly navrženy a syntetizovány receptory využívající porfyrinové jednotky k vázání fullerenu. Již dříve byl zkoumán vliv kovu komplexovaného porfyrinem a prostorového uspořádání receptoru na komplexaci fullerenu, proto jsme se rozhodli sledovat vliv substituce *meso*-arylporfyrinů v calixarenoporfyrinovém receptoru (Pr = propyl, R je buď vodík, propyl-, nebo trifluormethyllová skupina). Vliv substituce na interakci byl sledován pomocí ^1H NMR.



GENETICKÁ DETERMINACE DEGRADACE FENOLU V *Rhodococcus erythropolis*

**MARTIN VESELÝ, MONIKA KNOPPOVÁ,
JAN NEŠVERA a MIROSLAV PÁTEK**

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4
knoppova@biomed.cas.cz

Bakterie rodu *Rhodococcus* degradují řadu látek znečišťujících životní prostředí jako jsou fenoly a jejich deriváty, chlorované alifatické i cyklické uhlovodíky, nitrily a různé pesticidy. Hlavním faktorem omezujícím praktické

využití těchto degradačních schopností je dosud nedostatek vhodných genetických nástrojů pro jejich modifikaci. K vývoji základních nástrojů a metod genových manipulací jsme zvolili kmen *Rhodococcus erythropolis* CCM2595, který se vyznačuje schopností degradovat fenol a některé jeho deriváty (resorcinol, hydrochinon, chlorofenol). Tento kmen jsme zároveň zvolili pro izolaci genů degradace fenolu.

Pro studovaný kmen jsme vyvinuli základní metody umožňující transformaci kmene plasmidovou DNA, izolaci plasmidové a genomové DNA a integraci fragmentů do chromosomu. Na základě přirozeného plasmidu pSR1 z *Corynebacterium glutamicum* jsme zkonstruovali klonovací vektor pSRK21 replikující se v *E. coli*, *C. glutamicum* a *R. erythropolis*. Pro konstrukci promoter-probe vektoru jsme testovali potenciální reportérové geny: cat (chloramfenikol-acetyltransferasa), gfpuv (GFP, green fluorescent protein s emisí posunutou do UV oblasti) a rsgfp (red-shifted GFP). Na základě plasmidu pSRK21 byly zkonstruovány promoter-probe vektory pPRE11 (rsgfp) a pEPR (gfpuv) pro analýzu promotorů z *R. erythropolis*. Funkce vektoru pPRE11 byla ověřena klonováním několika promotorů z *C. glutamicum* u nichž byla změněna jejich aktivita v buňkách *R. erythropolis* a *C. glutamicum*.

Klíčovými geny pro degradaci fenolu jsou geny kódující fenolhydroxylasu a katecholdioxygenasu. Vyhledání těchto genů a ovlivnění jejich exprese, umožní konstrukci kmenů rozkládajících intenzivněji sledované polutanty. Všechny geny dráhy degradující fenol až na intermediáty centrálního metabolismu se nám podařilo izolovat: catA, catB, catC kódující katecholdioxygenasu, mukonatcykloisomerasu a mukonolaktionisomerasu, pheA1 a pheA2 kódující velkou a malou podjednotku fenolhydroxylasy a regulační geny catR a pheR.

Mezigenovou oblast catA-catR obsahující promotory těchto divergentně orientovaných genů jsme klonovali v obou orientacích do promoter-probe vektoru. Oba promotory (P-catR a P-catA) byly v *E. coli* aktivní. Na základě sekvence DNA jsme našli předpokládané transkripční počátky genů catR a catA. Palindromická sekvence přítomná v oblasti obou počátků transkripce může sloužit jako cílové místo pro vazbu regulačního proteinu. Transkripční počátek genu catR zjištěný experimentálně metodou primer extension v *E. coli* byl identický s předpokládaným transkripčním počátkem.

Delecí genu catR v chromosomu jsme získali kmen, který nebyl schopen růstu na fenolu. Tento výsledek naznačuje, že gen catR je nezbytný pro expresi některého genu nebo genů determinujících degradaci fenolu. Předpokládáme, že catR kóduje transkripční aktivátor operonu pro degradaci katecholu.

NEZNAMÝ PŮVOD ISOFLAVONOIDŮ V *Arabidopsis thaliana*

**RADKA KOBLOVSKÁ^a, ZUZANA MACKOVÁ^a,
BOŘIVOJ KLEJDUS^b, DAVID HONYS^{c,d} a
OLDŘICH LAPČÍK^a**

^aÚstav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha, ^bÚstav chemie a biochemie, MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cÚstav rostlinné

fyzologie, PřF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ^dInstitut experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha Radka.Koblovska@vscht.cz

Isoflavonoidy (3-fenylchromony) dlouhodobě přitahují pozornost humánní i veterinární medicíny díky svým četným biologickým aktivitám. Narozdíl od flavonoidů (2-fenylchromonů), rozšířených ve všech cévnatých rostlinách, isoflavonoidy byly dosud zaznamenány v omezeném počtu čeledí. To se obvykle vysvětluje omezeným výskytem isoflavonové synthasy (IFS). Tento enzym byl nedávno v několika zástupcích čeledí *Fabaceae* a *Chenopodiaceae* sekvenován a zařazen do podrodiny cytochromů P450 CYP93B2.

Naše pracovní skupina se zabývá screeningem čeledí, v nichž isoflavonoidy dosud nebyly popsány; využíváme přitom kombinace HPLC-MS a imunochemických metod. Celé spektrum metabolitů jsme jako první prokázali v ekonomicky významných čeledích *Rutaceae* a *Myrtaceae*. Z diskuse kolem těchto nálezů vyplynul zájem o zasazení výskytu isoflavonoidů mimo čeleď *Fabaceae* do genetického kontextu. Obrátili jsme proto pozornost na modelové organismy *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae* – brukvovitě) a *Nicotiana tabacum* (*Solanaceae* – lilkovitě). Tyto rostliny byly dosud považovány za neprodukcující isoflavonoidy – v případě *A. thaliana* byl tento předpoklad podpořen znalostí kompletního genomu, v němž chybí jakýkoli homolog známých isoflavonových synthas.

V *A. thaliana* jsme oběma metodickými postupy prokázali řadu 5-hydroxyisoflavonů i řadu 5-deoxyisoflavonů, ovšem v koncentracích řádu desetin až jednotek mg kg⁻¹ sušiny, které při použití běžných analytických postupů mohou být přehlédnuty. Ve veřejně přístupné genové databázi se nám podařilo identifikovat homology známých enzymů z rostlin čeledi *Fabaceae*, jež by mohly zodpovídat za metylace a glykosylace isoflavonů v *A. thaliana*, gen zodpovědný za syntézu isoflavonového jádra (v souladu s předchozími publikacemi) však nikoli. Vzhledem k tomu, že genom *A. thaliana* postrádá celou podrodinu P450 CYP93B2, jsme dospěli k názoru, že musí existovat jiný gen zodpovědný za biosyntézu isoflavonů.

Poděkování: Studie vznikla s podporou grantu GAČR 525/03/0352.

APOPTOSIS INDUCED BY IRON DEPRIVATION IN TUMOR CELLS

MICHAL KOČALKA, JAROSLAV TRUKSA, ZUZANA NAĐOVÁ, and JAN KOVÁŘ

Cell Growth Control Laboratory, Institute of Molecular Genetics, AS CR, Videňská 1083, 1420 20 Prague 4 xkocm@seznam.cz

Iron deprivation specifically induces apoptosis in some cultured tumor cells while other cells are resistant. In order to elucidate the mechanisms involved in apoptosis induction by iron deprivation, we studied the cellular events specifically coupled with the apoptosis induction. To discriminate between changes coupled only with iron deprivation and changes

involved in the induction of apoptosis by iron deprivation, we compared sensitive 38C13 cells and resistant EL4 cells. Iron deprivation was achieved by incubation in a defined iron-free medium. We detected caspase-3 activation as well as caspase-9 activation in sensitive cells under iron deprivation. Iron deprivation led to the release of cytochrome c from mitochondria in sensitive cells but it did not affect the cytosolic localization of Apaf-1. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was dissipated in sensitive cells due to iron deprivation, however, reactive oxygen species (ROS) production was not significantly affected. The antiapoptotic Bcl-2 protein was associated with mitochondria and the association did not change under iron deprivation. On the other hand, under iron deprivation we detected translocation of the proapoptotic Bax protein from the cytosol to mitochondria in sensitive cells. Taken together, we suggest that iron deprivation induces apoptosis in tested cells via mitochondrial changes concerning proapoptotic Bax translocation to mitochondria, collapse of the mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c from mitochondria, and activation of caspase-9 and caspase-3. Events upstream of Bax translocation during apoptosis induction by iron deprivation remain to be elucidated. However, the p53 pathway is not involved here as we demonstrated previously.

This study was supported by grants 301/01/0041 from the Grant Agency of the Czech Republic and B5052401 from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

SYNTÉZA A VLASTNOSTI INHIBITORŮ THYMINDFOSFORYLASY

PETR KOČALKA, RADEK POHL, DOMINIK REJMAN, a IVAN ROSENBERG

ÚOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, Praha 6; ivan@uochb.cas.cz

Angiogeneze je termín používaný k popisu tvorby nového cévního systému. Jde o důležitý proces během vývoje, při zánětu, ale i při růstu nádoru. Mezi důležité angiogenní faktory patří i thymidinofosforylasy (TP), která je právě ve vysokých hladinách exprimována v mnoha lidských solidních nádorech a míra její exprese je dávana do souvislosti s neovaskularizací, invazivností a metastází nádoru. TP podporuje migraci a angiogenezi endoteliálních buněk reverzibilním štěpením thymidinu na thymin (Schéma 1).

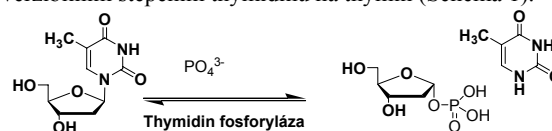


Schéma 1

Lze předpokládat, že by účinné inhibitory TP měly velký terapeutický význam. Předložená práce se zabývá syntézou, vlastnostmi a testováním nových typů thymidinových analog nesoucích pyrrolidinový kruh místo furanosového. S racemic-kou kyselinou jablečnou (Schéma 2) jako výchozí látkou byla

vypracována syntéza racemického *N*-chráněného 3-pyrrolidinolu, jenž slouží jako výchozí látka pro přípravu pyrrolidinových nukleosidů. Thymin byl alkylován *N*-chráněným 3-mesyloxy-pyrrolidinem za běžně používaných podmínek (DMF/Cs₂CO₃) v nízkém výtěžku na směs *N*- a *O*-derivátu, přičemž *O*-derivát převažoval. Změnou typu rozpouštědla a báze byly nalezeny podmínky poskytující přijatelný poměr *N*- a *O*-regioizomerů v uspokojivém výtěžku. Výsledkem práce je příprava analogů 2',3'-dideoxythymidin 5'-fosfátu s pyrrolidinovým kruhem a různými fosfonátovými funkcemi a jejich evaluace jako inhibitorů thymidinofosforylasy.

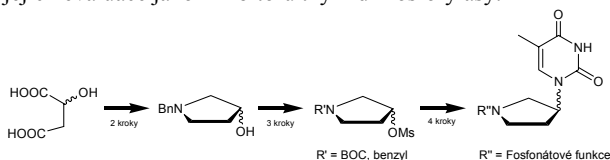


Schéma 2

Práce je podporována granty GA ČR 203/02/D150 a GA ČR A4055101 v rámci výzkumného záměru Z40550506.

CHARAKTERIZACE A AKTIVITA KATALYZÁTORU $\text{Re}_2\text{O}_7/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ PRO METATÉZI

JIRÍ KOPEČNÝ

Ústav organické technologie, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
kopecnyj@vscht.cz

V moderní organické syntéze jsou široce užívány katalytické reakce, které umožňují a zjednodušují přípravu organických látek. Jednou z nich je metatéze, reakce nenasycených organických molekul, nazývaná dříve disproportionace olefinů. Při reakci dochází k rozpadu a opětovnému vzniku dvojné vazby, schéma 1.

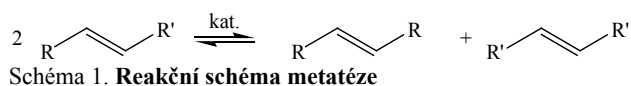


Schéma 1. Reakční schéma metatézy

Při metatézi dochází k výměně atomů nebo skupin atomů mezi dvěma molekulami, bez změny charakteru vazeb. Pro urychlování metatézy jsou užívány jak homogenní, tak heterogenní katalyzátory. Z technologického hlediska je používání heterogenních katalyzátorů upřednostňováno. Studovaný katalyzátor $\text{Re}_2\text{O}_7/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ se vyznačuje vysokou aktivitou a selektivitou.

Katalytický systém $\text{Re}_2\text{O}_7/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ byl studován metodami NH_3 -TPD a TPR. Jako katalyzátor byl připraven metodou nerovnovážné impregnace boehmitu roztokem NH_4ReO_4 . Výsledky aktivitních testů metatéz lineárních olefinů a olefinů s funkčními skupinami byly konfrontovány s acido-bázickými vlastnostmi a s redukovatelností aktivní složky. Taktéž byl zkoumán vliv typu reaktantu na rychlost deaktivace katalyzátoru. Z výsledků vyplývá, že Lewisova kyselost katalyzátoru má významný vliv na jeho aktivitu.

Práce je finančně podporována grantem č. 203/03/H140.

STRUKTURNĚ-FUNKČNÍ ANALÝZA LEKTINŮ PATOGENNÍ BAKTERIE *Ralstonia solanacearum*

NIKOLA KOSTLÁNOVÁ^a, EDWARD MITCHELL^b,
JEAN GAGNON^c, NECHAMA GILBOA-GARBER^d,
ANNE IMBERTY^e a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,f}

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul & ^fKatedra biochemie PřF, MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bE.S.R.F Experiment Division, BP220, F-38043 Grenoble cedex, France, ^cCNRS FRE 2685-Université J. Fourier, Faculté de Médecine & Pharmacie, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France ^dCERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 09, France, ^eBar-Ilan University, Faculty of Life Science, Ramat Gan 52900, Israel

Lektiny jsou proteiny neimunitní a neenzymatické povahy, které specificky a reverzibilně váží cukry a jiné glykokonjugáty, přičemž tato interakce je základem mnoha fyziologických i patologických procesů včetně fertilizace, imunitních odpovědí, buněčné adheze, rakovinného množení buněk a jiných. Lektinový systém rozpoznávání cukerných složek je také často využíván patogenními mikroorganismy k identifikaci a napadení hostitelského organismu. Detailní popis a pochopení molekulárních mechanismů využívaných patogenními bakteriemi k prvotnímu rozpoznání a napadení hostitele přináší nové, a často jediné, strategie boje proti těmto patogenním agens.

Mezi problematické mikroorganismy, proti nimž nebyla doposud objevena účinná terapie stejně jako se ještě nepodařilo vyšlechtit proti nim odolné odrůdy, patří i fytopatogenní bakterie *Ralstonia solanacearum*, která způsobuje uvadání mnoha ekonomicky významných plodin jakými jsou rajčata, brambory, banány a dalších přibližně 200 rostlin z 50 různých botanických rodin. *R. solanacearum*, která je schopna přežít dlouhodobě v půdě, začíná napadat hostitelský organismus přes jeho kořenový systém a poté s využitím systému rozvodu vody v rostlině ji celou systematicky infikuje¹. *R. solanacearum* je fylogeneticky příbuzná s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* – podmíněným humánním patogenem, který je silně agresivní k pacientům s cystickou fibrosou – u níž byla potvrzena souvislost mezi bakterií produkovanými lektiny a její patogenitou.

Tento příspěvek se zabývá souvislostmi mezi strukturou a funkcí tří doposud objevených lektinů z *R. solanacearum* (RSL, RS-IIL and RS20L), zjištěných na základě kombinace širokého spektra moderních metod, zahrnujících např. rentgenovou strukturní analýzu, mikrokcalorimetrii či metodu surface plasmon resonance. RSL (9,9 kDa) lektin vykazuje vysokou substrátovou specifitu k L-fukose a D-manose a je částečně sekvenčně homologní k lektinu AAL z houby *Aleuria aurantia*². RS-IIL (11,6 kDa) je D-manosu vázající lektin, který je sekvenčně i strukturně velice podobný lektinu PA-IIL z *P. aeruginosa*, přičemž velmi zajímavou se jeví jejich odlišná substrátová specifita³. Lektin RS20L (20 kDa) taktéž váže D-manosu a přestože není sekvenčně podobný žádné známé aminokyselinové sekvenci, vyřešení jeho krystalové struktury ukázalo, že je částečně strukturně homologní s živočišnými lektiny, galektiny.

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. Wimmerová M., Mitchell E., Sanchez J.F., Gautier C., Imberty A.: *J. Biol. Chem.* 278, 27059 (2003).
3. Sudakevitz D., Kostlánová N., Blatman-Jan G., Mitchell E., Lerrer B., Wimmerová M., Katcoff D.J., Imberty A., Gilboa-Garber N.: *Mol. Microbiol.* 52, 691 (2004).

PŘÍPRAVA NOVÝCH IMAC SORBENTŮ A JEJICH REVERSIBILNÍ INTERAKCE S IMUNOGLOBULINY

KATEŘINA KRÁČALÍKOVÁ^{a,b} a MIROSLAV BLEHA^a

^aÚstav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ^bFakulta Přírodovědecká, Universita Karlova, Albertov 6, 120 00 Praha 2

Chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (immobilized metal affinity chromatography - IMAC) je separační metoda používaná pro izolaci nebo studium buď přírodních nebo rekombinantních proteinů. Tato pseudo-biospecifická technika je založena na afinitě kationtů přechodných kovů (Mn^+), nejčastěji Ni^{2+} , Cu^{2+} nebo Zn^{2+} , imobilizovaných na pevné matici, k určitému seskupení aminokyselin na povrchu bílkoviny¹. Největší příspěvek vazby proteinu na imobilizovaný kovový kation se připisuje histidinům. Ionty Mn^+ jsou na pevnou matici imobilizovány prostřednictvím koordinace s chelatující skupinou, která je k matici připevněna kovalentní vazbou.

IMAC byla mimo jiné použita k separaci imunoglobulinů². V porovnání s jinými typy bílkovin, například albuminy, umožňuje přítomnost oligohistidinového jádra na C-konci molekuly imunoglobulinu relativně silnou interakci s imobilizovaným kationtem Mn^+ .

V současné době je nejpoužívanější pevnou matici (nosičem kovového iontu) v IMAC zesíťovaný agarosový gel Sepharose CL, ale existují též komerční sorbenty založené na syntetických polymerních maticích, např. Fractogel EMD Chelát. Vývoj nových syntetických maticí pro IMAC i jiné bioseparace je však stále ve stádiu rozvoje³.

Část našeho výzkumného programu je věnována studiu nových sorbentů připravených z kopolymerních nebo terpolymerních maticí kovalentním navázáním chelatující skupiny-kyseliny iminodioxové (IDA).

K přípravě maticí jsou používány tyto monomery: oxiranylmethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (GMA), 2-(2-hydroxyethoxy)-ethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (DEGMA) a síťovadlo 1,2-ethandiylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (EDMA). Vysoce hydrofilní, komerčně nedostupný monomer DEGMA byl využit ke zvýšení hydrofility matrice a tím i ke zlepšení efektivity IMAC procesu potlačením nežádoucích hydrofobních interakcí.

Porozita a morfologie připravených maticí byla studována rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM), rtuťovou porozimetrií, měřením specifického povrchu BET experimentem a stanovením botnavosti v různých rozpouštědlech.

Po navázání chelatující skupiny (IDA) na matici a vytvoření komplexů Ni^{2+} -IDA byla studována afinita přírodních imunoglobulinů k připraveným sorbentům. Byl vyhodnocen vliv struktury matrice na množství navázaných proteinů. Jsou diskutovány možnosti eluce specificky navázaných imunoglobulinů z různých maticí a ovlivnění pevnosti vazby proteinu na sorbent variací koncentrace imobilizovaného nikelnatého komplexu.

Výzkum je podporován granty GA AV ČR (A 4050910), AV ČR (K 4055109), AVOZ 40500505.

LITERATURA

1. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature* 258, 598 (1975).
2. Hale J. E., Beidler D. E.: *Anal. Biochem.* 222, 29 (1994).
3. Garipcan B., Andac M., Uzun L., Denizli A.: *React. Funct. Polym.* 59, 119 (2004).

IMOBILIZACE CELÝCH BUNĚK *Rhodococcus equi* A4 V HYDROGELU A POZOROVÁNÍ JEJICH NITRILHYDRATASOVÉ A AMIDASOVÉ AKTIVITY

DAVID KUBÁČ a LUDMILA MARTÍNKOVÁ

Mikrobiologický ústav, Akademie věd ČR, Videňská 1083, 14220 Praha
kubacd@vscht.cz

Biokatalýza je v současné době velice populární metoda. Přináší ve srovnání s běžnými chemickými postupy celou řadu výhod. Reakce katalyzované enzymy nebo celobuněčnými katalyzátory zpravidla probíhají za mírných podmínek, stereo- a regiospecificky. Mikrobiální hydrolyza nitrilů jak už přírodních tak i některých syntetických je využívána v řadě průmyslových aplikací. U bakteriálních buněk *Rhodococcus equi* A4 byla již dříve pozorována hydrolytická aktivita k široké škále nitrilů.

Imobilizace biokatalyzátoru přináší oproti suspenznímu způsobu celou řadu výhod. Především opakované použití imobilizovaných buněk nebo možnost použití průtočného bioreaktoru.

Tato práce je zaměřena na nalezení optimálních reakčních podmínek a vhodného množství biokatalyzátoru pro imobilizované buňky *Rhodococcus equi* A4 a srovnání jejich aktivity s tradiční suspenzí buněk. Dále byly za zjištěných optimálních podmínek provedeny série opakovaných biotransformací a zjišťován postupný pokles aktivity. Na základě těchto měření byl nalezen vhodný počet opakování biotransformační reakce s jednou vsádkou biokatalyzátoru.

REGULÁCIA EXPRESIE ANTIONKOGÉNU p53 POMOCOU RNA INTERFERENCIE

**BRANISLAV KUSENDA, ROMANA BORSKÁ, BORIS
TICHÝ, JANA KOTAŠKOVÁ, SOŇA ŠTRUNCOVÁ a
ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ**

*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní
hematoonkologická klinika, FN Brno, Černopolní 9, 625 00
Brno*

Antionkogén p53 je silný transkripčný faktor, ktorý hrá významnú rolu v regulácii bunkového cyklu. Mutácie tumorsupresorového génu p53, vyskytujúce sa vo viac ako 50 % ľudských nádorových buniek, vedú k neschopnosti p53 zúčastňovať sa na regulácii bunkového cyklu a spustiť apoptotické dráhy. Tieto zmeny nemusia nutne viesť ku kompletnej strate funkcie p53 ako sekvenčne špecifického regulátora transkripcie, ale môžu viesť aj onkogenéze v závislosti od typu mutácie. RNA interferencia (RNAi) bolo popísaná ako proces posttranskripčného utlmovania génovej expresie (PSTGS), sprostredkovaný dvojreťazcovými molekulami RNA, slúžiaci nielen ako regulačný, ale aj ako obranný mechanizmus bunky proti vírusom a transpozónom. Tento prístup sme použili na utlmenie expresie p53 u nádorových bunkových línií s rozličnými mutáciami, za účelom určiť a porovnať efekty prítomnosti wt a mutantnej formy p53 na transkriptom nádorových buniek.

Skonstruovali sme vektor pPRO.sh.RNA, konštitutívne exprimujúci krátke vlásenkové RNA (shRNA) cielené proti p53 a zelený fluorescenčný proteín (EGFP), ktorý umožňuje stanovenie účinnosti transfekcie a sortovanie buniek (FACS). Z shRNA pôsobením enzýmu DICER vznikajú siRNA (small interfering RNA) s dĺžkou 21 bp a stávajú sa súčasťou komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), ktorý sa s vysokou špecifitou viaže na komplementárne p53-mRNA a spôsobuje ich deštrukciu a posttranskripčné utlmenie génovej expresie. Vysokú špecifitu interakcie siRNA a mRNA, umožňuje rozpoznanie a odlišenie mutantných RNA a ich špecifickú inaktiváciu. Túto špecifitu sme využili na navrhnutie sekvencií pre shRNA cielených proti WT a proti mutantnej alele p53, ktoré sme tiež úspešne klonovali do pPRO.sh.RNA.

Úspešne sa nám podarilo utlmiť expresiu wt aj mutaného génu p53 a efektívnosťou do 90 %, čo bolo detekované na úrovni RNA pomocou qRT-PCR a na úrovni proteínov pomocou western-blotting. Následná čipová analýza génovej expresie nádorových buniek u ktorých bola expresia p53 utlmená pomocou RNAi, priniesla jedinečné informácie o zmenách v p53 signálnej dráhe spôsobených mutáciami v géne p53. Utlmenie expresie nefunkčného génu pre proteín p53 prostredníctvom siRNA sa javí ako progresívny prístup pre selektívnu a personalizovanú protinádorovú génovú terapiu.

Práca bola podporovaná grantom MŠMT IK04017C a grantom Elpida – Nukleus.

EXPRESIE HODINOVÉHO GENU PERIOD1 VE VYVÍJEJÍCÍM SE CIRKADIÁNNÍM SYSTÉMU POTKANA A JEJÍ OVLIVNĚNÍ DÉLKOU DNE

**K. LAURINOVÁ, Z. KOVÁČIKOVÁ, M. SLÁDEK,
Z. BENDOVI, H. ILLNEROVÁ a A. SUMOVÁ**

*Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Videňská
1083, 140 00, Praha 4*

Za vznik cirkadiánních rytmů je zodpovědný systém transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček tvořený tzv. hodinovými geny a jejich proteinovými produkty. Hodinový gen Period1 (Per1) i jeho proteinový produkt PERIOD1 (PER1) jsou důležitou součástí tohoto systému. V suprachiasmatických jádrech (SCN) hypothalamu dospělých potkanů vykazuje exprese Per1 cirkadiánní rytmus a denní profil Per1 mRNA i produkce PER1 proteinu jsou ovlivněny délkou světelné části dne, tzv. fotoperiodou. Cirkadiánní rytmus v tvorbě Per1 mRNA v SCN byl u mláďat prokázán 3. den po narození a vliv fotoperiody na SCN se projevil již 10. den po narození.

Cílem této práce bylo zjistit jak se vyvíjí rytmus v tvorbě PER1 proteinu v SCN potkaních mláďat a zda je denní profil Per1 mRNA, resp. produkce PER1 proteinu již ovlivněn fotoperiodou. Samice s mláďaty byly chovány na světelném režimu s 12 hodinami světla a 12 hodinami tmy (LD 12:12) nebo na umělé dlouhé (LD 16:8) či krátké fotoperiodě (LD 8:16). Mláďata byla 3. (P3) nebo 10. den (P10) po narození převedena do konstantní tmy a odebrána každé 2 hodiny. Na mozkových řezech byly stanoveny 24-hodinové profily Per1 mRNA v SCN pomocí *in situ* hybridizace s 35S- značenou RNA sondou. Denní profily PER1 proteinu v SCN byly stanoveny imunohistochemicky.

Bylo zjištěno že produkce PER1 proteinu v SCN vykazuje v P3 i v P10 při LD 12:12 cirkadiánní rytmus. V P3 fotoperioda neměla na profil Per1 mRNA v SCN vliv. V P10 byl denní profil Per1 mRNA i PER1 proteinu mírně ovlivněn fotoperiodou.

Z našich výsledků je patrné že již u 3-denních mláďat je produkce PER1 proteinu v SCN rytmická a rytmus se mezi P3 a P10 postupně vyvíjí. Expresie Per1 stejně jako produkce PER1 v SCN potkaního mláďete začíná reagovat na fotoperiodu mezi P3 a P10. V P10 vliv fotoperiody zatím nedosahuje stejné úrovně jako u dospělých zvířat.

Vzniklo za podpory GA ČR, granty č. 309050350 a 30902D093.

STUDY OF TRANSPORT MECHANISMS OF DIAGNOSTIC AGENT B22956 IN LIVER DERIVED CELL LINES

ANTONÍN LIBRA^a, CRISTINA FERNETTI^b, MASSIMO VISIGALLI^c, VITO LORUSSO^c, PIER LUCIO ANELLI^c, FRANTIŠEK ŠTAUD^a, CLAUDIO TIRIBELLI^b and LORELLA PASCOLO^b

^aDepartment of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, ^bDepartment BBCM, University of Trieste and Centro Studi Fegato, AREA Science Park, Basovizza SS 14 Km 163,5 34012 Trieste, Italy, ^cCentro Ricerche Milano, Bracco Imaging SpA, Via Folli 50, 20134 Milano, Italy

B22956 is a new low molecular weight gadolinium chelate which belongs to the class of intravascular (blood pool) contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). It is excreted predominantly by biliary excretion and could be therefore potentially advantageous in hepatobiliary imaging.

To investigate the molecular mechanisms of hepatic transport of B22956 in models of human liver-derived cells and to compare the expression of selected passive transporters on transcriptional level.

Methods: B22956 uptake was measured in hepatic HepG2 and Chang liver cell lines. Absolute quantitative real-time RT-PCR analyses, using cloned PCR products as standards, were performed on total RNA of human normal liver, HepG2 and Chang liver cells to evaluate the transcription of twelve transport genes possibly involved in hepatic uptake: OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP 8, OAT2, OAT3, OCT1, NTCP, PEPT-1, PEPT-2.

Kinetic constants in the two cell lines showed a 3 times more efficient transport (V_{max}/K_m) of B22956 in Chang liver than in HepG2 cells (6.5 vs. 1.9 pmol/ μ M.mg prot.sec, respectively). The B22956 transport was inhibited by CCK8 which is a specific substrate of OATP-8. Real-time RT-PCR analyses revealed that all the genes, except OAT3, were expressed in normal liver.

Different transcription profiles of transporters were observed in both cell lines. In HepG2 cells the expression of OATP C, OATP-D and OATP-8 was greatly repressed (up to 104 times lower values than normal liver) while OATP-B and OATs expression was either maintained or increased. On the contrary, in Chang liver cells OAT genes were undetectable, while the expression of OATP-D, OATP-E and OATP-8 was similar to normal liver (from 104 to 106 copies per μ g of transcribed RNA).

Transport studies and gene expression analyses indicate that B22956 is a good substrate to the liver specific OATP-8, which has been reported to be poorly expressed or absent in liver tumors. The higher transport of B22956 in Chang liver cells points to the additional involvement of OATP-D and OATP-E. It could be speculated that B22956 will be helpful in detecting hepatic tumoral lesions by contrast enhanced MRI.

TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF *Arabidopsis thaliana* CELL CULTURE TO AN ALKYLATING AGENT

JIŘÍ LIBUS and HELENA ŠTORCHOVÁ

Institute of Experimental Botany ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
libus@ueb.cas.cz

Alkylating agents modify biologically active molecules including DNA and proteins, whereby interfere with vital functions. Methyl methanesulfonate (MMS) has been established as one of the model methylation agents¹, mainly in the DNA repair studies. According to Angelis², MMS causes DNA damage clearly detectable by single cell gel electrophoresis of *Arabidopsis* nuclei at 10 mM concentration, while no significant increase of DNA fragmentation occurs at 1 mM concentration (both after two hours of treatment).

We have used the 10 mM and 0.5 mM concentrations of MMS to treat *Arabidopsis thaliana* cell culture, and assayed for expression levels of chosen genes in time series to find transcripts whose abundance changes in response to alkylation stress.

The cell culture was placed in media containing respective concentration of MMS and harvested at different time points. Total RNA was isolated and reverse transcribed using 32P dATP. The probes were hybridized to nylon membrane-based cDNA arrays containing ESTs from the collection of Max Planck Institut fuer Zuechtungsforschung, Cologne, and cDNA fragments cloned by RT-PCR. The images were quantified by QuantityOne software (BIORAD). Results and Conclusions: We have analyzed expression profiles of approximately 350 genes at several time points (related to the onset of MMS treatment) to choose some of them for further analysis by Real Time PCR (currently under process). The preliminary semi-quantitative array experiments enabled us to concentrate on better candidate genes from the wide selection undertaken when designing the array.

REFERENCES

1. Jelinsky S.A., Samson L.D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 1486.
2. Menke M., Chen I., Angelis K.J., Schubert I.: Mutat. Res. 2001, 87.

NESOUČINNÝ PRŮBĚH CYKLOADIČNÍCH REAKCÍ DERIVÁTŮ 2-VINYLTIOFENU S DIMETHYL-ACETYLENDIKARBOXYLÁTEM

ALEŠ MACHARA, MILAN KURFÜRST, VÁCLAV KOZMÍK a JIŘÍ SVOBODA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, PŠČ 166 28, Praha 6
ales.machara@seznam.cz

Nedávno bylo zjištěno, že topologie kondenzovaných derivátů vinylthiofenu podstatně ovlivňuje jejich stabilitu a reaktivitu¹⁻³.

V návaznosti na tyto poznatky budou prezentovány výsledky studia cykloadičních reakcí různých 2-vinylthiofenových derivátů s dimethyl-acetylendikarboxylátem. Kromě produktů 1:1 reakce byly získány i produkty následných cykloadičních a enových reakcí. K nejzávažnějším zjištěním však patří, že pravděpodobně nesoučinný mechanismus reakce vede při spoluúčasti atomu síry k rozšíření thiofenového kruhu na thiopyranový a následně až k derivátům thialenů (pseudoazulenů). Dále bude diskutován vliv rozpouštědla a účinných katalyzátorů Dielsových-Alderových reakcí na průběh reakce. Na základě struktur izolovaných látek (Schéma 1) a jejich distribuci byly navrženy mechanismy vzniku produktů.

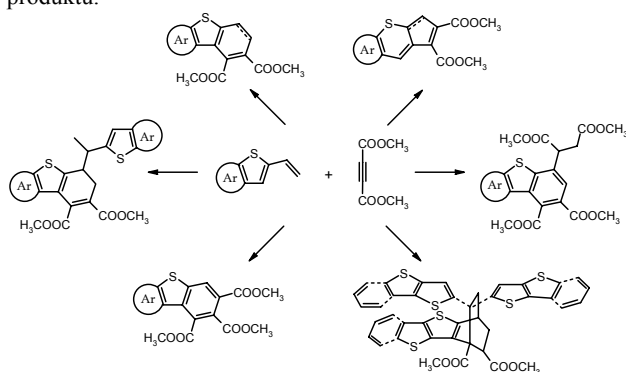


Schéma 1

Práce byla podporována grantem MŠMT ČR (projekt č. MSM 22310000) a GA ČR (projekt č. 202/02/0840).

LITERATURA

1. Svoboda J., Pihera P., Sedmera P., Paleček J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *61*, 888 (1999).
2. Váchal P., Pihera P., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *62*, 1468 (1997).
3. Pihera P., Dvořáková H., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *64*, 389 (1999).
4. Machara A., Kurfürst M., Kozmík V., Petříčková H., Dvořáková H., Svoboda J.: Tetrahedron Lett. *45*, 2189 (2004).

THERMAL STABILITY OF THE HUMAN ACID α 1-GLYCOPROTEIN IN SYSTEMS WATER-LOW ALIPHATIC ALCOHOL

LINDA MARŠÁLKOVÁ and VLADIMÍR KARPENKO

Department of Physical and Macromolecular Chemistry,
Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2

Acid α 1-glycoprotein (AGP) is a protein from the α 1-globuline fraction of human blood serum¹ classified among the superfamily of lipocalins. Its molecule contains 183 amino acids with 21 possible substitutions in one polypeptide chain linked by two disulfide bonds. The content of carbohydrate moiety is slightly

over 40 % of the total molecular weight¹ (41 kDa) of AGP, and five branched carbohydrate units are linked by the *N*-glycoside bond to asparagine residues of the peptide chain². All carbohydrate units are terminated by sialic acid residues, their total number being 15. The isoelectric point of AGP has been found to vary between pH 1.8 and 2.7, depending on the buffer chosen. The native structure of AGP is characterized by a low α -helix content and a high of β -sheet³ content. Although AGP has been studied for over fifty years, all attempts at its X-ray analysis have failed; there is only a 3D computer model⁴ of the peptide part of the AGP molecule. The physiological role of this protein is also not entirely clear.

The thermal stability of the acid α 1-glycoprotein has been studied in water-methanol and water-ethanol systems in the acid region between pH 2 and 6 by the temperature perturbation difference spectroscopy (TPDS), fluorescence spectroscopy, and circular dichroism (CD). In all experiments the sample was heated, cooled, and heated again within the temperature range of 25 °C to 80 °C, with 5 °C steps. At each temperature the corresponding spectrum was recorded. The concentration of alcohols, expressed as volume fraction, was 24 % for methanol and 24.1 % for ethanol. The following wavelength regions were used: TPD spectra 240–320 nm, fluorescence spectra 290 - 500 nm with an excitation wavelength of 286 nm, and circular dichroic spectra 200–260 nm. This study included both native and desialyzed AGP. TPD and fluorescence spectra were examined using principal component analysis.

The results allow the following conclusions: (i) In the acid region, the behavior of AGP in the presence of small aliphatic alcohols is less reversible than in comparison to aqueous solutions of the same pH. (ii) The typical cooperative behavior of small globular molecules is apparent at the pH values higher than 4, in the region where AGP molecules have a negative net charge. (iii) Extremely low AGP solubility of AGP was observed in the presence of both methanol and ethanol at pH 3; because of this effect, which occurs in a very narrow range of pH values, it was necessary to decrease the volume fraction of alcohols in the system at this pH to 1.26 % for methanol and 12.34 % for ethanol. (iv) Desialyzed AGP retains its high solubility at pH 3 over the whole temperature range in the presence of 24 % of both methanol and ethanol in the system; this observation supports the probable role of dissociated sialic acid residues in the process of AGP aggregation at this pH. (v) CD spectra indicate the influence of small aliphatic alcohols on the secondary structure of AGP: higher concentrations of alcohols increase the α -helix content and stabilize this structure at the expense of β -sheet. CD spectra deserve to be studied more deeply toward a better understanding of the influence of pH, alcohol, and temperature change on the content of secondary structure motives in AGP molecules. Improving the AGP4 computer model and its comparison with experimental data would be essential the contributions toward characterizing the behavior of AGP molecules under various conditions, including those involving mixed solvents.

REFERENCES

1. Schmid K., in: *Alpha1-Acid Glycoprotein: Genetics, Biochemistry, Physiological Functions, and Pharmacology* (P. Baumann et al., ed.), p.7. Alan R. Liss Inc. 1989.

- Schmid K., Kaufmann H., Isemura S., Bauer F., Emura J., Motoyama T., Ishiguro M., Nanno S.: *Biochemistry* 12, 2711 (1973).
- Kodíček M., Infanzón A., Karpenko V.: *Biochim. Biophys. Acta* 1246, 10 (1995).
- Kopecký V. jr., Ettrich R., Hofbauerová K., Baumruk V.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 300, 41 (2002).

VÝVOJ POTENCIÁLNÍCH ANTITUBERKULOTIK O NOVÉM MECHANISMU ÚČINKU

JOSEF MATYK, HANA DIVIŠOVÁ a PETRA HUSÁKOVÁ

*Katedra anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
matyk@faf.cuni.cz*

Počátek 21. století lze nazvat obdobím návratu tuberkulózy do průmyslově vyspělých zemí. Při vývoji nových antituberkulotik mají největší význam preparáty o novém mechanismu účinku. V devadesátých letech minulého století se objevily práce, ukazující na nový mechanismus účinku salicylanilidů¹.

Sdělení iniciovalo široký výzkum nových antituberkulotik z této skupiny. Na našem pracovišti bylo nedávno prokázáno, že stejný mechanismus účinku mají také benzoxazindiony². Na základě předchozích prací provedených na našem pracovišti^{3,4} jsem se soustředil na hledání nových vysoce účinných izosterních sloučenin. Úspěšnými byly halogenované v acylové části 4-alkylsalicylanilidy a jim odpovídající 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony. Širokým spektrem účinku (hodnoceném *in vitro*) překonávají soudobá léčiva.

Práce je součástí výzkumného záměru MSM 111600001.

LITERATURA

- Hlasta D.J., Demers J.P., Folenó B.D., Fraga-Spano S.A., Guan J.H., Hilliard J.J., Macielag M.J., Ohemeng K.A., Sheppard C.M., Sui Z.H., Webb G.C., Weidner-Wells M.A., Werblood H., Barrett J.F.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1923 (1998).
- Waisser K., Dražková K., Holý P., Palát jr. K., Kaustová J.: *Folia Pharm. Univ. Carol.* 29, 17 (2003).
- Waisser K., Pesina M., Holy P., Pour M., Bures O., Kunes J., Klimesova V., Buchta V., Kubanova P., Kaustova J.: *Arch. Pharm.* 336, 322 (2003).
- Waisser K., Bureš O., Holý P., Kunes J., Oswald R., Jiraskova L., Pour M., Klimesova V., Palat K., Kaustova J., Danse H.M., Mollmann U.: *Pharmazie* 58, 83 (2003).

siRNA INHIBICE OVER-EXPRIMOVANÝCH GENŮ U CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

MICHAELA MERKEROVÁ, HANA BRUCHOVÁ a RADIM BRDIČKA

Ústav hematologie a krevní transfúze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2

V posledních letech se při analýzách genové exprese začíná uplatňovat technologie RNAi (RNA interference). Jedná se o specifické post-transkripční tlumení genů způsobené vnesením cizorodé dsRNA do buňky. Ta je endonukleázou Dicer štěpena na 21–23 nt krátké siRNA (short interfering RNAs), které po inkorporaci do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) způsobí rozštěpení komplementárních molekul mRNA a tím inhibici exprese daného genu.

Chronická myeloidní leukemie (CML) je charakterizována fúzním genem BCR/ABL, který má pravděpodobně rozhodující úlohu při vzniku a rozvoji onemocnění. Abychom více porozuměli mechanismu transformace, zaměřila se naše laboratoř na hledání dalších odlišností v genové expresi hemopoetických buněk pacientů s CML. Analýzy expresního profilu provedené pomocí cDNA biočipů vedly k identifikaci několika genů se signifikantně zvýšenou expresí¹⁻³, jejichž význam v leukemogenezi chceme objasnit siRNA-inhibicí. Následný dopad tlumení genů na dynamiku exprese budeme sledovat pomocí expresních čipů. Jedním z genů, který by se potenciálně mohl podílet na vzniku či progresi onemocnění, je PCNA (proliferating cyclic nuclear antigen). Pomocí siRNA proti tomuto genu byly optimalizovány podmínky pro transfekci primárních leukemických buněk a buněčných linií K562 a MOLM-7 odvozených od CML. Jedním z nejproblematictějších kroků je vnesení siRNA do buněk. Bylo vyzkoušeno několik druhů transfekčních činidel: Metafectene (Biontex), Oligofectamine (Qiagen), siPORT Amine (Ambion) a ExGene 500 (Fermentas), a dále elektroporace a nukleofekce. Účinnost transfekce byla ověřována pomocí siRNA značené fluoresceinem, míra inhibice byla sledována na úrovni mRNA pomocí RT-PCR v reálném čase a na proteinové úrovni pomocí western blotů. U buněčných linií bylo pomocí Oligofectaminu dosaženo poklesu hladiny mRNA o 70 %. U primárních buněk se jako jediná vhodná z testovaných metod ukázala nukleofekce, pomocí níž byla snížena genová exprese o 60 %. Z dalších testovaných podmínek transfekce byly vybrány následující: 50nM koncentrace siRNA a 1×10⁶ buněk/ml, nejvhodnější doba kultivace buněk po transfekci je 48h.

Na základě výsledků této práce byly navrženy metody pro transfekci siRNA do buněčných linií a primárních buněk získaných od CML pacientů. Tuto techniku chceme přenést i na další over-exprimované geny a sledovat dopad siRNA-inhibice genů na expresní profil ovlivněných buněk. siRNA proti některým z up-regulovaných genů by navíc mohly být v budoucnu využity pro genovou terapii hematologických malignit.

Podpořeno IGA MZ ČR: NR 7989-3.

LITERATURA

- Bruchová H., Klamová H., Brdička R.: *Čas. Lék. Čes.* 139, 655 (2000).

2. Bruchova H., Borovanova T., Brdicka R.: *BIOforum Int.* 5, 259 (2001).
3. Bruchova H., Borovanova T., Klamova H., Brdicka R.: *Leukemia Lymphoma* 43, 1289 (2002).

INHIBITORY CDK ROSCOVITIN A OLOMOUCIN II AKTIVUJÍ NÁDOROVÝ SUPRESOR p53 PROSTŘEDNICTVÍM TRANKRIPČNÍHO STRESU

**PETR MÜLLER^a, VLADIMÍR KRYŠTOF^b,
STJEPAN ULDRIJAN^a, MIROSLAV STRNAD^b a
BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^a**

^a*Oddělení experimentální onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 65653 Brno,* ^b*Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc*

Jedním z nejvýznamnějších kroků v procesu maligní nádorové transformace je omezení funkce nádorového supresoru p53, které je nejčastěji způsobeno mutací jeho genu a nebo zvýšením degradace tohoto proteinu. Úspěšná léčba nádorového onemocnění chemo- nebo radioterapií je mnohdy závislá na úspěšné aktivaci proteinu p53 genotoxickým stresem. Tato práce se zabývá novými možnostmi aktivace proteinu p53 cestou inhibice cyklin dependentních kinas (CDK).

Roscovitin i olomoucín II jsou nové syntetické deriváty purinu s potenciálními protinádorovými účinky, které zastavují buněčný cyklus a aktivují protein p53 bez nežádoucího poškození DNA. Inhibice aktivity CDK těmito látkami vede k transkripčnímu stresu a snížení syntézy RNA. I nízké koncentrace těchto látek (5 μ M olomoucín II a 20 μ M roscovitin) vedly k rozpadu jádérka a aktivaci proteinu p53 u buněk nádorových linií MCF-7 a ARN8. Zvýšení transkripční aktivity proteinu p53 bylo měřeno jednak pomocí reportérového genu idukujícího β -galaktosidázou a jednak detekcí zvýšené exprese proteinu p21^{WAF1} a proteinu MDM2. Abychom ověřili předpoklad, že protein p53 je aktivován v důsledku transkripčního stresu a rozpadu jádérka, analyzovali jsme lokalizaci a interakce proteinu L11. Tento ribosomální protein se specificky uvolňuje z jádérka při snížení syntézy rRNA a aktivuje protein p53 tím, že interaguje s proteinem MDM2 a inhibuje tak degradaci proteinu p53. Po působení olomoucínu II i roscovitinu jsme imunocytochemicky detekovali rozpad nukleolu u buněk MCF-7 a uvolnění proteinu L11 do nukleoplazmy. Uvolnění proteinu L11 bylo následováno indukci proteinu p53 a aktivací exprese jeho cílových genů MDM2 a p21^{WAF1}. Pomocí imunoprecipitace jsme ověřili specifickou interakci mezi proteinem MDM2 a L11 po působení roscovitinu i olomoucínu II.

Aktivace proteinu p53 cestou inhibice CDK ukazuje jistou alternativu ke klasické genotoxické terapii. Inhibice CDK purinovými analogy a následné uvolnění jadérových proteinů se zdá být využitelné u nádorů u nichž je protein p53 zvýšeně degradován prostřednictvím vysoké aktivity onkogenu MDM2. Naše výsledky rovněž ukazují významnou potenciální účinku těchto inhibitorů s terapeuticky užívanými látkami (Etoposid, Doxorubicin, Camptothecin).

Tato práce byla podporována granty IGA NR/8338-3 a GA ČR 204/03/D231.

NIKLEM KATALYZOVANÁ AKTIVACE: TVORBA VS. ŠTĚPENÍ C-C VAZEB

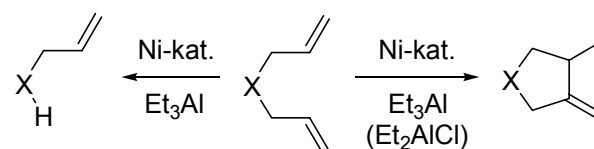
**DAVID NEČAS^a, MATYÁŠ TURSKÝ^a a
MARTIN KOTORA^{a,b}**

^a*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2*

^b*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
katora@natur.cuni.cz, david.necas@seznam.cz*

Tvorba a štěpení C-C vazeb pomocí katalytických systémů na bázi komplexů přechodných kovů je dnes intenzivně studovanou oblastí v oboru organických syntéz. Jednou z možných reakcí alkenů s komplexy přechodných kovů je tvorba organokovových sloučenin za vzniku vazby C-kov a tyto látky většinou reagují dále za vzniku jedné či více nových vazeb C-C. Typickým zástupcem těchto reakcí jsou polymerace¹ či cyklizace² dienů. Dosažení opačného procesu, tj. degradace alkenů na menší celky není příliš známé. Katalytické štěpení vazeb C-C pomocí komplexů přechodných kovů je sice známá reakce, ale probíhá většinou pouze s látkami se silným sterickým pnutím, kde hnací silou je snížení tohoto pnutí³.

Tento projekt vychází z předešlého studia železem katalyzovaných cyklizací 2-chlor- α,ω -dienů⁴, při kterém jsme našli nový a snadno použitelný katalytický systém na bázi Ni. Vhodnou volbou výchozího dienu, reakčních podmínek a změnou molárních poměrů jednotlivých komponent katalytického systému je možné dosáhnout buď tvorby vazeb C-C (cyklizace), či změnit směr reakce a dosáhnout štěpení C-C vazeb (deallylace)⁵. Tento jev byl podroben zkoumání z hlediska reakčního mechanismu a vlivu struktury výchozí sloučeniny na přednostní průběh reakce.



Práce byla podpořena grantem GA ČR 203/03/H140.

LITERATURA

1. Chen E. Y. X., Marks T. J.: *Chem. Rev.* 100, 1391 (2000).
2. (a) Knight K. S., Waymouth R. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6268 (1991).
(b) Yamamoto Y., Ohkoshi N., Kameda M., Itoh K.: *J. Org. Chem.* 64, 2178 (1999).
3. Bishop K.C. III.: *Chem. Rev.* 76, 461 (1976).
4. Nečas D., Kotora M., Čiřařová I.: *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 1280.
5. Nečas D., Turský M., Kotora M.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10222 (2004).

PŘÍPRAVA 6-ARYLPURINYL-NUKLEOSIDŮ KATALYTICKOU CYKLOTRIMERIZACÍ

PETR NOVÁK, PAVEL TUREK a MARTIN KOTORA

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta
UK v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha 2
katora@natur.cuni.cz*

Sloučeniny, které obsahují 6-arylpurinové báze (např. nukleosidy), vykazují biologickou aktivitu (cytostatická, antibakteriální, antimykobakteriální atd.). Jednou z možností jejich přípravy je vedle cross-couplingových reakcí cyklotrimerizace. Je možné využít [2+2+2] cyklotrimerizaci 6-alkynylpurinů s diyny katalyzovanou komplexy přechodných kovů (zejména Ni a Co). Za těchto podmínek byly zkoušeny pouze cyklotrimerizace s 9-allyl a 9-THP ochráněnými 6-alkynylpuriny.

Tématem této práce bylo připravit 6-alkynylpuryl-nukleosidy pomocí [2+2+2]-cyklotrimerizace 6-alkynylpuryl-nukleosidů s diyny. Tyto reakce byly katalyzovány Ni(II) komplexem (NiBr₂(dpppe)), který byl *in situ* redukován pomocí Zn(0). Pro reakce byla využita celá řada různých substituovaných diynů (R = H, alkyl, fenylyl, SiMe₃; X = C(COOEt)₂, C(OMe)₂, C(COOEt)CN, C(COOEt)COMe, NTs, NPh). Reakce proběhly dle očekávání a poskytly odpovídající produkty v dobrých výtěžcích.

LITERATURA

- (a) Turek P., Kotora M., Hocek M., Císařová I.: *Tetrahedron Lett.* 44, 785 (2003).
- (b) Turek P., Kotora M., Tišlerová I., Hocek M., Votruba I., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 69, 9224 (2004).

CHEMICKÉ METODY HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY STRUKTURNĚ ODLIŠNÝCH LÁTEK

RADKA OPATŘILOVÁ

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

Jedním z faktorů, kterému je v současnosti připisována stále větší role v rozvoji patologických procesů v jakémkoliv organismu, jsou volné radikály. Jedná se o vysoce reaktivní formy kyslíku a dusíku, které mohou reagovat s celou řadou látek a narušovat tak jejich funkci. Látky mající schopnost zamezit jejich působení se nazývají antioxidanty, zhášeči nebo scavengery radikálů. V posledních desetiletích je studováno antioxidační a antiradikálové působení řady známých, ale i nově syntetizovaných látek, vhodných pro komplexní léčbu nemocí, na jejichž patogenезi se spolupodílejí volné radikály. K testování antioxidační a antiradikálové aktivity byla vyvinuta celá řada analytických metod. Jimi se stanovuje celková antioxidační kapacita i schopnost zhášet jednotlivé typy volných radikálů. Mnohé z nich jsou však velmi náročné na laboratorní vybavení nebo postup. Z tohoto důvodu se stále

optimalizují nové metody nenáročné na vybavení a dostupné v běžných laboratorních podmínkách.

V práci se zaměřuji na srovnání metod zhášení:

- stabilního radikálu 2,2-difenylyl-1-pikrylhydrazilu, spektrofotometricky při 517 nm,
- oxidu dusnatého tzv. Griessovou reakcí, spektrofotometricky při 540 nm,
- „radikálu“ bromu ve stavu zrodu, modelová metoda, kde je radikál generován chemickou reakcí KBrO₃ a KBr, titračně a spektrofotometricky při 360 nm,
- peroxidu vodíku H₂O₂, který sice není volným radikálem, ale prochází však snadno buněčnými membránami, a proto může oxidovat látky daleko od místa svého vzniku, titračně,
- chloraminu, používaného pro jeho silný oxidační efekt, titračně a spektrofotometricky (reakcí s metolem a kyselinou sulfanilovou) při 520 nm.

Těmito metodami byla otestována řada látek různých chemických struktur, u nichž je antioxidační účinek předpokládán nebo žádán. A to aminophenazon, fenazon, kyselina salicylová; látky působící protizánětlivě. Methionin, N-acetylcystein, glutathion patří mezi thioly. Flavonoid rutin a kvercetin. Kyselina askorbová (vitamin C) se oxidačně přijímá dvěma elektrony na kyselinu dehydroaskorbovou. Metody byly použity i pro hodnocení nově připravených látek, série derivátů aryloxyaminopropanolu, popř. heteroarylaminoethanolu. Tyto látky byly připraveny na Ústavu chemických léčiv jako potenciální antagonisté beta-adrenergních receptorů a antidysrytmika, vhodná i pro terapii vysokého tlaku. Na vzniku hypertenze se podílí aterosklerotický plak vzniklý usazováním oxidovaného cholesterolu na stěny cév, proto by antioxidační účinek látek byl pro tuto skupinu velice žádoucí. Jako porovnávací byl zvolen již v praxi používaný hydrochlorid propranololu.

Práce byla realizována v rámci řešení post-dok grantu GA ČR 203/03/D182

REZISTENCE PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ K LÉČBĚ GLIVECEM

**EVA OTÁHALOVÁ, JANA MORAVCOVÁ, HANA
KLAMOVIČOVÁ a CEDRIK HAŠKOVEC**

*Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1,12820
Praha 2
eva.otahalova@uhkt.cz*

Chronická myeloidní leukemie (CML) je charakterizována přítomností hybridního genu BCR/ABL. Tento gen se nachází u více než 95 % případů onemocnění CML a monitorování hladiny jeho exprese na úrovni mRNA slouží ke sledování průběhu onemocnění. Při úspěšné léčbě dochází ke snížení hladiny, naopak vzrůstající množství transkriptu BCR/ABL upozorňuje na progresi choroby. Produkt genu BCR/ABL, onkoprotein BCR/ABL, je nositelem tyrosin-kinasové aktivity, která je v porovnání s proteinem c-ABL konstitutivně zvýšena. Zapojení proteinu BCR/ABL do signálních drah ovlivňujících proliferaci, diferenciaci a apoptosu buněk vede k nekontrolovatelné transformaci buňky.

Léčbou první volby u pacientů s CML se stává Glivec (imatinib mesylate, STI571). Molekula Glivecu specificky kompetuje v proteinu BCR/ABL o vazebné místo s ATP a tím inhibuje jeho tyrosinkinázovou aktivitu. Problémem je existence primární a také sekundární rezistence, která vzniká v průběhu léčby především u pacientů s pokročilejším stadiem onemocnění. Bylo prokázáno, že rezistence je způsobena mutacemi ve vazebné smyčce pro ATP, amplifikací genu BCR-ABL, případně zapojením kinas rodiny Src¹, které mohou přebírat roli BCR/ABL v patogenezi buňky.

Potencionálním markerem primární rezistence CML pacientů ke Glivecu se zdá být gen WT1 (Wilms' tumor suppressor gene)². Tento gen je mimo jiné silně exprimován v řadě hematologických malignit. V případě CML je možným prognostickým markerem – hladina transkriptů koreluje s průběhem nemoci.

V naší studii byly k určení primární rezistence prováděny krátkodobé *in vitro* kultivace primárních buněk s Glivecem. Vlastnosti buněk byly dále charakterizovány určením jejich vitality, proliferační schopnosti – exprese proliferačního faktoru Ki67, apoptosy – aktivita caspasy-3 a také stanovením hladiny exprese genů BCR/ABL a WT1. Byly použity leukocyty izolované z periferní krve BCR/ABL pozitivních CML pacientů před i během léčby Glivecem a BCR/ABL pozitivní buněčná linie K562. Jako negativní kontrola byly užity buňky BCR/ABL negativní – leukocyty zdravých dárců a buněčná linie ML2. K určení exprese jednotlivých genů bylo použito metod kvantitativní RT-PCR.

V případě BCR/ABL pozitivních buněk (linií K562 a leukocytů většiny CML pacientů) vedla inkubace s Glivecem k inhibici růstu, snížení proliferační schopnosti, zvýšené indukci apoptosy a snížení exprese genů BCR/ABL a WT1. U kontrolních buněk tento jev pozorován nebyl. Leukocyty pacientů, u kterých nebyl *in vitro* zjištěn inhibiční vliv Glivecu nebo kteří se stali rezistentní k léčbě Glivecem, byly následně inkubovány s inhibitory kinas rodiny Src, jak a dalších.

Získané výsledky naznačují možnost využití exprese genu WT1 k určení primární rezistence CML pacientů k léčbě Glivecem. Výsledky dále naznačují, že u rezistentních pacientů mohou alespoň částečně roli BCR-ABL přebírat jiné proteinkinasy.

Podporováno grantem IGA NC/3721 MZČR

LITERATURA

1. Donato N. J., Wu J.Y., Albitar M.: Blood 98, 770a (2001).
2. Cilloni D., Saglio G.: Semin Hematol 40, 37 (2003).

TECHNIKY EPITOPOVÉHO MAPOVÁNÍ PRO VYHLEDÁVÁNÍ ALERGENNÍCH EPITOPŮ POTRAVINOVÝCH ALERGENŮ

ŠÁRKA OUZKÁ^a, JANA KŘENKOVÁ^{a,b}, LUCIE ŠTĚPÁNOVÁ^c, ZUZANA BÍLKOVÁ^c a JOSEF KRÁLOVSKÝ^a

^aKatedra analytické chemie a ^cKatedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice.

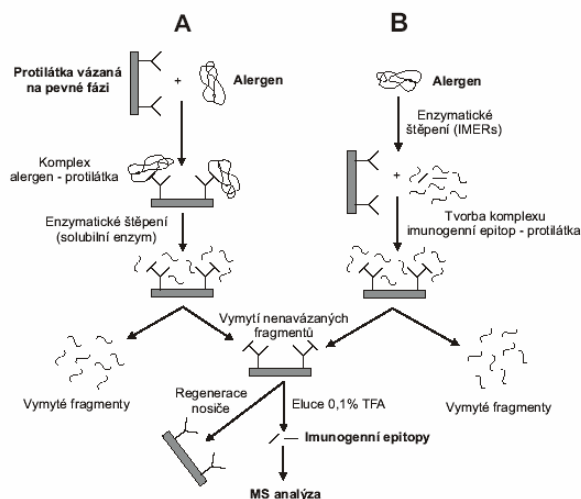
^bÚstav Analytické Chemie AV ČR, Veverí 97, 611 42 Brno.
Sarka.Ouzka@upce.cz

Alergie se dnes stává skutečně závažným medicínským problémem s rostoucím trendem, v současné době postihuje 15–25 % populace. Do popředí se dostává vývoj tzv. bezpečných vakcín pro léčbu alergií s použitím krátkých lineárních peptidů, odpovídajících imunogenním epitopům daného alergenu. K identifikaci těchto imunogenních epitopů slouží techniky epitopového mapování.

Naším cílem je zavést metodu pro rychlé vyhledávání a izolaci alergenních epitopů potravinových alergenů s použitím nově vyvinutých magnetických enzymových (IMERs) a imunoafinitních (IMARs) reaktorů v kombinaci s technikami epitopového mapování „Epitope extraction“ a „Epitope excision“ spolu s MS analýzou eluovaných imunogenních epitopů.

Samotná technika epitopového mapování „Epitope excision“ pro potravinové alergeny (obr. 1A) spočívá v limitované enzymatické proteolýze daného alergenu v komplexu se svou specifickou IgE protilátkou, vázanou na pevné fázi (tj. na magnetickém nosiči). Navázané zůstávají pouze fragmenty chráněné vazebným místem protilátky (tzv. imunogenní epitopy alergenu). Při technice „Epitope extraction“ (obr. 1B) se po proteolýze vybraného alergenu v roztoku (za použití IMERs specificky vychytají IgE protilátkou, vázanou na pevné fázi, imunogenní epitopy alergenu. Po důkladném promytí nenavázaných fragmentů je imunogenní epitop eluován pomocí 0,1% TFA a analyzován pomocí ESI, MALDI-TOF nebo FT-ICR-MS. Pro tuto techniku byl vybrán modelový systém: potravinový alergen ovalbumin (OVA) a poly- i monoklonální anti-ovalbuminové protilátky. Jednotlivé kroky této techniky bylo třeba optimalizovat.

V první fázi byla provedena optimalizace limitované i celkové proteolýzy modelového alergenu OVA pomocí IMERs s imobilizovaným nativním i TPCK-trypsinem. U tohoto enzymového reaktoru byla sledována operační i skladovací stabilita enzymu. Vzorky po proteolýze byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, TSDS-PAGE, CZE a ESI-TOF-MS.



Obr. 1. Schéma technik epitopového mapování – „Epitope excision“ (A) a „Epitope extraction“ (B)

Ve druhé fázi byla provedena optimalizace imobilizace protilátek na různé nosiče s cílem vybrat nejvhodnější nosič i způsob imobilizace protilátek, aby byla zajištěna co nejnižší nespecifická sorpce proteinů (peptidů) a maximální rezistence IMAR vůči proteolýze vybranými enzymy.

Nyní budou techniky „Epitope excision“ a „Epitope extraction“ v daném uspořádání použity pro vybraný modelový systém s identifikací imunogenních epitopů OVA a poté je zamýšlíme použít pro studium konkrétních reálných alergenů, např. zkrřížené reagujících alergenů jablka Mal d 1 a břízy Bet v 1 apod.

KONFORMAČNÍ STUDIUM PIGMENT- PROTEINOVÉHO KOMPLEXU REAKČNÍHO CENTRA FOTOSYSTÉMU II (PSII RC).

PETR PALEŇČÁR^a, F. VÁCHA^{a,c} a M. KUTÝ^{a,b}

^aÚstav Fyzikální Biologie, Jihočeská Univerzita, České Budějovice a ^bÚstav ekologie krajiny, AV ČR, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, ^cÚstav Molekulární Biologie Rostlin, AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Fotosystém II (PSII) je pigment-proteinový komplex lokalizovaný v tylakoidové membráně cyanobakterií, řas a vyšších rostlin. Nedávno byly analyzovány změny v excitonických interakcích v reakčních centrech (RC) PSII RC pigmentů vlivem světlem indukované oxidace primárního donoru (P680) nebo vlivem redukce primárního akceptoru feofitinu a (Phe a) použitím absorpčních spekter a spekter cirkulárního dichroismu (CD)¹. V kontrastu s oxidací primárního donoru, byla světlem indukovaná změna CD spektra vlivem redukce primárního akceptoru teplotně závislá. Z toho vyplývá hypotéza, že při pokojové teplotě redukovaný Phe a indukuje konformační změny v RC proteinech. Tyto změny ovlivňují excitonické interakce RC chlorofylů. Pro lepší pochopení a interpretace nameřených optických spekter² bylo využito molekulární dynamiky (MD) pro studium konformačních změn a *ab initio* výpočtu pro PSII RC pigmenty.

Zřezaný PSII RC byl zkonstruován použitím současné krystalové struktury z *Thermosynechococcus elongatus* (PDB code: 1S5L)³ pro použití v MD simulacích. Parametry silového pole (FF) PSII RC pigmentů vyšších rostlin byly spočteny *ab initio* a částečně získané z různých studií bakteriálních pigmentů typu a^{4,5} a hemových prostetických skupin⁶. Byly provedeny výpočty nábojové distribuce na molekule redukovaného Phe a na okolních aminokyselinách. Relativní změny vypočtených spekter jsou diskutovány a porovnávány s experimentálními daty.

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the CR (MSM6007665808, GACR206/02/D177) and by the Academy of Sciences of the CR (Institutional research concept AVOZ60870520).

LITERATURA

1. Vacha F., Durchan M., Siffel P.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1554, 147 (2002).

2. Vacha F., Psencik J., Kutý M., Durchan M., Siffel P.: *Photosynth. Res.* In press, (2005).
3. Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S.: *Science* 303, 1831 (2004).
4. Foloppe N., Ferrand M., Breton J., Smith J.C.: *Proteins.* 22, 226 (1995).
5. Ceccarelli M., Procacci P., Marchi M.: *J. Comput. Chem.* 24, 129 (2003).
6. Autenrieth F., Tajkhorshid E., Baudry J., Luthey-Schulten Z.: *J. Comput. Chem.* 25, 1613 (2004).

ANTIMITOTICKÝ EFEKT MYOSEVERINU A JEHO 8-AZAANALOGU

**MARTINA PAPRSKÁŘOVÁ^a, VLADIMÍR KRYŠTOF^a,
LIBOR HAVLÍČEK^b a MIROSLAV STRNAD^{a,*}**

^aLaboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta University Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^bIzotopová laboratoř, Ústav exp. botaniky AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha *strnad@prfholt.upol.cz*

Mikrotubuly tvoří jednu z částí cytoskeletárního systému eukaryotických buněk. Jedná se o dynamická polární vlákna sestávající z tubulinových heterodimerů. Mikrotubuly plní celou řadu funkcí – jsou stavební součástí membrán a buněčných struktur, odpovídají za intracelulární transport a buněčnou signalizaci, a v neposlední řadě řídí segregaci chromozómů v metafázi a cytokinezi buňky¹. Mikrotubulární systém se tak stal slibným cílem pro vývoj nových, specificky zaměřených látek, které by otevřely cestu k účinnější léčbě nádorových onemocnění.

Jedním z nových inhibitorů polymerizace tubulinu je také 9-isopropyl-2,6-bis[(4-methoxybenzyl)amino]-9H-purin známý pod názvem myoseverin^{2,3}. V *in vitro* podmínkách myoseverin indukuje reversibilní štěpení polyjaderných myotubů na jednojaderné úseky fragmentací mikrotubulárního cytoskeletu. Na rozdíl od ostatních mitotických jedů zatím nebyl popsán jeho cytotoxický efekt na nádorovou buňku. Studovali jsme a srovnávali účinky myoseverinu a nově syntetizovaného analogu 8-azamyoseverinu na lidské buněčné nádorové linie. Obě látky způsobovaly inhibici polymerizace tubulinu, prokázanou imunodetekcí mikrotubulárního cytoskeletu v buňkách. Účinnost obou látek byla závislá na typu buněčné linie a na jejich koncentraci. Analýza buněčného cyklu ošetřených buněk průtokovou cytometrií potvrdila výrazný blok buněk v mitotické fázi, který byl po delším časovém působení inhibitoru následován apoptosou. Přítomnost apoptotických buněk byla ověřena i imunodetekcí (western blot) peptidového fragmentu poly(ADP-ribosyl)polymerasy, který vzniká specificky v apoptotických buňkách.

Práce vznikla za přispění Grantové agentury ČR (projekty 303/02/0875 a 204/03/D231).

LITERATURA

1. Mollinedo F., Gajate C.: *Apoptosis* 8, 413 (2003).

- Rosania G.R., Chang Y.T., Perez O., Sutherlin D., Dong H., Lockhart D.J., Schultz P.G.: *Nature Biotechnol.* 18, 304 (2000).
- Franěk F., Siglerová V., Havlíček L., Strnad M., Eckschlager T., Weigl E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 257 (2002).

THE ROLE OF PHOSPHOLIPID SIGNALLING IN ALUMINUM TOXICITY IN PLANTS

**PŘEMYSL PEJCHAR^{a,b}, ZUZANA NOVOTNA^a,
OLGA VALENTOVA^a a JAN MARTINEC^b**

^aDepartment of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology Prague, ^bInstitute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague
premysl.pejchar@vscht.cz

Cessation of root growth and changes in root morphology as the most important physiological consequence of aluminum toxicity in plants suggesting a role of the root cytoskeleton as a target structure¹. Plant cytoskeleton research is now focused on the regulation of cytoskeletal dynamics².

In animal organisms is cytoskeleton remodelling regulated by phospholipid degrading enzymes, phospholipase C (PLC) and phospholipase D (PLD)³. The aim of presented work is to find whether plant phospholipid-cytoskeleton signalling is part of molecular mechanism of aluminum toxicity that is still far from being understood.

Fluorescently labelled substrate (BODIPY-phosphatidylcholine) was incorporated into the tobacco cell line BY-2. Labelled cells were then treated with AlCl₃ and butanol (inhibitor of PLD). Products of phospholipases action were analysed in different time intervals in methanol/chloroform cell extracts by HP-TLC and/or HPLC.

Changes of the amount of lysophosphatidylcholine (product of PLA2 action), diacylglycerol (product of PLC) as well as phosphatidic acid (product of PLD) within 30 min of aluminum (0.1 mM AlCl₃) treatment were observed. Al³⁺ affects level of phospholipase products in dose-dependent manner. Butanol decreased the amount of unknown product (probably regulated by PLD) belonging to phospholipid signalling pathway as well. Its identification is currently in progress.

This work was supported by grant of Czech Science Foundation no. 522/05/0340.

REFERENCES

- Jones D.L., Kochian L.V.: *FEBS Lett.* 400, 51 (1997).
- Schwarzerova K., Zelenkova S., Nick P., Opatrný Z.: *Plant Cell Physiol.* 43, 207, (2002).
- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., Lavie Y., Tang X.: *BBA – Mol. Cell Biol. Lipids* 1439, 245 (1999).

ORGANIZACE EMBRYÍ VE SHLUCÍCH RANÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU ZTEPILÉHO (*Picea abies* /L./ KARST.)

**JIŘÍ PETŘEK^a, LADISLAV HAVEL^a, JAN VÍTEČEK^a,
HELENA VLAŠÍNOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^b, PETR
BABULA^c, KAREL BARTUŠEK^d, DAVID POTĚŠIL^a a
RENÉ KIZEK^a**

^aÚstav biologie rostlin, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cÚstav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno, ^dÚstav přístrojové techniky, AVČR, Kotlářská 2, 611 37 Brno
j.petrek@email.cz

Studium vlivu cizorodých látek (např. ke sledování vlivu těžkých kovů na růst, životnost a tvorbu specifických proteinů) na smrk ztepilý (*Picea abies* /L./ Karst.) je v přirozených podmínkách velmi náročné, proto se hledají možnosti, jak tento výzkum co nejvíce zjednodušit. Jednou z možností, které se v poslední době stále častěji využívá, je studium explantátových kultur raných somatických embryí smrku ztepilého. V naší práci byl růst těchto kultur sledován pomocí vážení čerstvé hmotnosti nebo analýzou obrazu (IA – image analysis) shluků RSE (SRSE). Pro studium životnosti jednotlivých SRSE byla využita aktivita intracelulárních esteraz jako marker aktivního metabolismu a dvojitě barvení, které je založeno na selektivní permeabilitě cytoplazmatické membrány. Dále bylo využito barvení SRSE 1% roztokem 2,3,5-trifenylnitroimidazolium chloridem (TTC) pro studium aktivity buněčného dýchání.

Předpokládali jsme, že růst shluků raných somatických embryí (SRSE) bude ovlivněn procesem subkultivace (nutné přemístění explantátu na čerstvé médium s dostatkem živin). Pomocí metody analýzy obrazu bylo zjištěno, že je přírůstek SRSE po pasážování závislý na jeho počáteční velikosti a také na prostorové orientaci embryí. Při nedodržení původní orientace byl přírůstek SRSE výrazně menší, asi o 20–40 %. Se stářím kultury se zvyšoval vliv orientace SRSE (rozlišení nahore a dole) na její růst. Na základě tohoto zjištění byla stanovena životnost embryí v jednotlivých částech SRSE fluorescenčními barvivy fluoresceindiacetátem a propidium jodidem (dvojitě barvení). Životnost embryí byla nejvyšší ve vnějších částech shluku (90–96 %), zatímco vnitřní části vykazovaly životnost do 10 %. Embrya z jednotlivých částí shluku byla dále kultivována a byl sledován jejich další růst. Explantáty získané ze všech částí SRSE obsahovaly RSE schopná růstu. Přírůstek SRSE pocházejících z vnějších částí byl větší než přírůstek SRSE z vnitřních částí, ale rozdíl se s délkou kultivace a počtem subkultivací snižoval. Pro další studium struktury SRSE byla využita nukleární magnetická rezonance (NMR), která jasně ukázala zvýšenou metabolickou aktivitu ve vnějších částech SRSE. Z našich výsledků jasně vyplývá, že je embryogenní kultura SRSE smrku ztepilého diferenciována.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GA ČR 525/04/P132, IGA FaF VFU IG342012 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Arnold S.: *J. Plant Physiol.* 128, 233 (1987).
2. Havel L., Durzan D.J.: *Int. J. Plant Sci.* 157, 8 (1996).
3. Petřek J., Vacek J., Viteček J., Vlašínová H., Kizek R., Havel L.: *Anal. Bioanal. Chem.*, v tisku.

ULTRASENZITIVNÍ DETEKCE METALOTHIONEINU POMOCÍ CHRONOPOTENCIOMETRICKÉ ROZPOUŠTĚCÍ ANALÝZY

JITKA PETRLOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}, DAVID POTĚŠIL^{a,b}, ONDŘEJ BLAŠTÍK^a a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie MU, PŘF Kotlářská 2, 611 37 Brno

Metalothionein (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních (6–10 kDa)^{1,2} na cystein velmi bohatých proteinů (až 30 %). MT obsahuje tyto základní strukturální motivy: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cys³. MT se skládají ze dvou domén α , β , které jsou složeny z cysteinových klastrů. β -Doména má tři vazebná místa pro dvojmočné ionty a α -doména čtyři. Hlavní biologickou funkcí MT je homeostatická kontrola a detoxikace těžkých kovů (Zn, Cu a Cd). Často diskutovanou otázkou je schopnost MT transportovat atomy kovů a udržovat tak homeostázu některých esenciálních prvků. Díky těmto významným vlastnostem se hledají nové metody pro snadnou a rychlou detekci MT, které by bylo možné využít i mimo specializované laboratoře.

Analýza byla provedena na AUTOLAB analyzátoru napojeném na VA-Stand 663 v tříelektrodovém zapojení. Vzorky tělních tekutin (lidské krevní sérum a moč) byly před vlastní analýzou upraveny denaturací při 99 °C po dobu 10 min a 15 min centrifugovány 14 000 x g. V naší práci bylo využito katalytického vylučování vodíku ze základního elektrolytu prostřednictvím MT (pík H)^{4,5}, které jsme sledovali pomocí chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy (CPSA). Tato metodika umožnila ultrasenzitivní detekci MT. Limit detekce (3S/N) MT byl 11 zmol v 5 μ l vzorku. Dále byl studován vliv biologické matrice (lidské moči a krevního séra) na katalytický signál. Matrice snižovala signál MT, proto se limit detekce stanovení MT pohyboval kolem 350 fmol. V námi testovaných vzorcích lidského séra od zdravých jedinců byla zjištěna průměrná koncentrace MT 1,1 \pm 0,015 μ M (n=5).

Jak se ukazuje, katalytické signály vylučování vodíku umožňují velmi senzitivní analýzu MT v biologické matrici. Vysoce senzitivní techniky jsou naléhavou nutností, protože hladina MT není jen markerem vlivu těžkých kovů na organismus, ale také potenciálním markerem agresivních nádorových onemocnění.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GA,ČR 525/04/P132 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Kāgi J. H. R., Schäffer A.: *Biochemistry* 27, 8509 (1988).

2. Kāgi J. H. R.: *Methods Enzymol.* 205, 613 (1993).
3. Studničková M., Turánek J., Zábřhová H., Krejčí M., Kysel M.: *J. Electroanal. Chem.* 421, 25 (1997).
4. Kizek R., Trnková L., Paleček E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
5. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Němec M.: *Bioelectrochem.* 60, 29 (2003).

PHOTODYNAMIC TREATMENT SUPPRESSES Bcr-Abl PROTEIN EXPRESSION IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIC – DERIVED CELL LINE K562 AND DISRUPTS THE CYTOSKELETON STRUCTURE

MICHAELA PLUSKALOVÁ, P. HALADA, I. MARINOV, and Z. HRKAL

Ústav hematologie a krevní transfúze, Oddělení buněčné biochemie, U nemocnice 1, 128 00 Praha 2

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a malignancy of the hematopoietic stem cell. The molecular cause of the disease is known as Philadelphia chromosome. The permanent expression and the abnormal enzymatic activation of an oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase is critical to the disease progression. CML – derived cell line K562 was employed for the research of the action of photodynamic therapy ALA-PDT.

We addressed the question, whether or not a programmed cell death, apoptosis was induced. We obtained some signs of apoptotic induction in response to ALA-PDT treatment, but rather necrosis than a terminal phase of apoptosis was achieved. Further we focused on a description of some molecular mechanisms of K562 cell resistance to the progression of apoptosis, which might be induced by ALA-PDT. We revealed some molecular chaperons that are involved in the K562 cell protection against the termination of the ALA-PDT induced apoptosis. Hsp27 was downregulated in response to the ALA-PDT treatment, nevertheless the remaining Hsp27 and a basal level of Hsp70 was significantly increased in comparison with HL60 cells, which we employed as a model of the ALA-PDT induced apoptosis. On the other hand Hsp60 bearing pro-apoptotic properties remained without any response to ALA-PDT.

Imatinib mesylate was uncovered as a potent inhibitor of the oncogenic tyrosine kinase Bcr-Abl activity and has been successfully used for treatment of CML patients. However, the response to imatinib treatment is poor in some cases due to mutations of bcr-abl gene in the imatinib target place. The alternative way of the CML treatment is an inhibition of molecular chaperon Hsp90. Phosphorylation of Hsp90 causes the dissociation of multiprotein complex Hsp90/p23/ p50/Bcr-Abl and leads to a proteasome degradation of Bcr-Abl. ALA-PDT induced the phosphorylation of Hsp90 and release of the co-chaperone p23 from Hsp90. This resulted in a dissociation of Hsp90 client proteins and the protein level of oncogene Bcr-Abl decreased in K562 cells by 70 % within three hours after treatment.

Downregulation of Bcr-Abl kinase affected proteins, which are responsible for the cytoskeleton organisation.

Cofilin was dephosphorylated and thus was unable to preserve actin in polymeric state. Also phosphorylation of a cytoskeletal protein Septin-2 was affected. Forty five percent of treated cells possess a damaged cytoskeleton within two hours after ALA-PDT treatment. Practically most of the treated cells (92 %) contained damaged polymeric actin filaments the day after the treatment.

The work was supported by grant NL 7681-3 of Internal Grant Agency, Ministry of Health Czech Republic.

KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI DIFOSFINOAZINOVÝCH LIGANDŮ V RHODIOVÝCH KOMPLEXECH

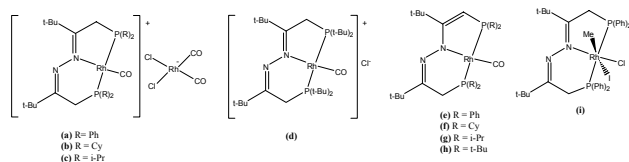
**MARTIN POŠTA^a, PAVEL VOJTÍŠEK^b, JAN SÝKORA^a
a JAN ČERMÁK^a**

^aÚstav chemických procesů, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02
Praha 6, ^bKatedra anorganické chemie, Univerzita Karlova,
Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

Je známo, že fosfinové bidentátní ligandy, popřípadě terdentátní P, N, P' ligandy velmi často tvoří s přechodnými kovy aktivní komplexy uplatňující se v celé řadě katalytických cyklů.

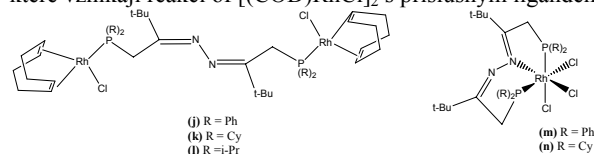
Difosfinoazinové komplexy se kromě celé škály koordinačních módů (P, P' můstkový, P, P' chelatující, P, N, P') vyznačují také zcela novým způsobem tvorby koordinační nenasycenosti popsané Shawem u komplexů iridia, které vznikající rychlou reverzibilní izomerací azinového na en-hydrazonový skelet.

Při studiu difosfinoazinových komplexů Rh(I) a Rh(III) jsme kromě koordinačních vlastností ligandů s odstupňovanou sterickou náročností studovali také možnosti tvorby koordinační nenasycenosti Shawova typu u komplexů rhodia. Čtvercově planární komplexy (**a**, **b**, **c**, **d**) byly připraveny reakcí $[\text{Rh}(\text{CO})_2\text{Cl}]_2$ s příslušným ligandem. Působením bazí je možné docílit abstrakce protonu z azinového skeletu za vzniku en-hydrazonového komplexu (**e**, **f**, **g**, **h**), přičemž objemnost fosfinových skupin a charakter protianiontu jsou klíčové pro výběr vhodné báze. Zatímco k deprotonaci terbutylového komplexu postačuje slabá báze, jako například triethylamin, k docílení stejného efektu u zbývajících komplexů je nutno použít MeONa.



Předběžně byly také studovány stechiometrické reakce s potenciálními substráty katalytických reakcí. V rámci tohoto výzkumu byla například pozorována tvorba oktaedrického komplexu trojmočného rhodia (**i**), jakožto produktu oxidativní adice MeI na komplex (**a**).

Druhou skupinou difosfinoazinových komplexů Rh(I) jsou komplexy „můstkové“ s konfigurací ligandu Z,Z (**j**, **k**, **l**), které vznikají reakcí of $[(\text{COD})\text{RhCl}]_2$ s příslušným ligandem.



Tyto můstkové komplexy (**j**, **l**) tvoří stáním v CHCl_3 oktaedrický faciální komplex Rh(III) (**m**), popřípadě zahříváním v témže rozpouštědle vzniká komplex (**n**). Tento typ reakce je velmi zajímavý z hlediska katalytických vlastností, neboť se s největší pravděpodobností generuje CHCl_2^{\cdot} radikál a komplexy (**j**, **l**) tak reagují ve smyslu Kharashovy adice.

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou ČR (grant č. 203/01/0554).

LITERATURA

- Perera S.D., Shaw B.L., Thornton-Pett M.: J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1996, 3111.

ZMĚNA ELEKTROCHEMICKÉHO SIGNÁLU „OCHRÁNCE GENOMU“ V ZÁVISLOSTI NA JEHO STRUKTURNÍ FORMĚ – RYCHLÉ A SENZITIVNÍ ROZLIŠENÍ NATIVNÍ, DENATUROVANÉ A AGREGOVANÉ FORMY p53

**DAVID POTĚŠIL^{a,b}, MICHAL MASAŘÍK^c, BOŘIVOJ
VOJTÍŠEK^d, JITKA PETROVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}
a RENÉ KIZEK^a**

^aÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1,
613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie, PřF MU v Brně,
Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cLaboratoř biofyzikální chemie a
molekulární onkologie, BFÚ AV ČR, Královopolská 135,
612 65 Brno, ^dZákladna experimentální onkologie, MOÚ Brno,
Žlutý kopec 7, Brno 656 53

Protein p53, nazývaný „ochránce genomu“, je transkripční faktor, který je v buňce běžně přítomen v nízkých koncentracích. Při buněčném stresu intracelulární koncentrace p53 vzroste a vznikají tetramerní jednotky p53, které mají vysokou afinitu k DNA. Po vazbě na DNA p53 reguluje transkripci mnoha cílových genů. Mezi nejvýznamnější projevy této interakce patří zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, reparace DNA a spuštění apoptózy. Vazba proteinu p53 na DNA je tedy klíčovým předpokladem funkce proteinu. Přítomnost mutantní formy proteinu p53, stejně tak i strukturně modifikované (např. denaturací nebo agregací) molekuly p53, je v některých případech prokazatelným důvodem vzniku rakovinného bujení. Statistiky uvádějí, že gen kódující protein p53 (TP53) je poškozen bodovou či deleční mutací u více než 50 % nádorových buněk (u rakoviny plic až 70 %). Se strukturální změnou proteinu p53 jsou spojovány například Alzheimerova a Parkinsonova nemoc, cystická fibróza, prionové nemoci a jiné. V této práci byla studována nativní,

denaturovaná a agregovaná forma proteinu p53 pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED). V první části byla optimalizována metoda FIA-ED pro stanovení nativní formy proteinu p53. Jako optimální mobilní fáze byl zjištěn fosfátový pufr (1/15 M, pH 7,0) o rychlosti průtoku $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Při optimalizaci elektrochemického stanovení byla na základě hydrodynamického voltamperogramu vybrána jako nevhodnější hodnota potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu 900 mV. Optimalizovaná metoda poskytovala lineární ($R_2 = 0,9998$) elektrochemickou odpověď v závislosti na koncentraci proteinu p53. Vypočtený limit detekce ($3 \times S/N$) byl 45,8 amol proteinu p53 na nástřík 5 μl . Technika FIA-ED byla dále aplikována na studium a rozlišení strukturálních změn proteinu p53 (vznik denaturované a agregované formy). Bylo zjištěno, že denaturovaná forma poskytuje přibližně $3 \times$ vyšší proudovou odezvu oproti formě nativní (rozvolnění struktury proteinu, přístup větší části elektroaktivních center proteinu – aminokyselinových zbytků k povrchu elektrody). U agregované formy byl naopak zjištěn pokles proudového signálu (sterické bránění elektroaktivních skupin proteinu). Zjištěná fakta ukazují, že jsme schopni velmi senzitivně stanovit a rozlišit nativní, denaturovanou a agregovanou formu proteinu p53 v attomolárních hladinách pomocí optimalizované FIA-ED techniky.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GAČR 525/04/P132 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Fei P., El-Deiry W. S.: *Oncogene* 22, 5774 (2003).
2. Elledge R. M., Lee W. H.: *BioEssays* 17, 923 (1995).
3. Potěšil D., Petřelová J., Vacek J., Brázdová M., Zelená J., Lubal P., Kizek R.: VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů 2004, 65.
5. Brázda V., Paleček E.: *Biol. Listy* 64, 161 (1999).
6. Bullock A. N., Henckel J., DeDecker B. S., Johnson C. M., Nikolova P. V., Proctor M. R., Lane D. P., Fersht A. R.: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94.
7. Lane D. P.: *Nature* 385, 15 (1992).

REKURENTNÍ MUTACE V ADAMTS13 JE PŘÍČINOU VROZENÉ FORMY TROMBOTICKÉ TROMBOCYTOPENICKÉ PURPURY V ČESKÉ REPUBLICCE

ŠIMON RITTICH, PAVEL JINICH, JIŘÍ SUTTNAR, PETER SALAJ a INGRID HRACHOVINOVÁ

*Ústav hematologie a krevní transfúze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
rittich@uhkt.cz*

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) je letální onemocnění, které je charakterizováno získanou trombocytopenií, mikroangiopatickou hemolýzou, neurologickou poruchou, případně renální dysfunkcí¹. Nedávno bylo zjištěno², že TTP je pravděpodobně způsobeno hlubokým funkčním defektem metaloproteinázy ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin 1

like elements). Proteináza specificky štěpí velmi velké ($> 20 \times 10^3 \text{ kDa}$) silně adhezivní multimery von Willebrandova faktoru (vWF) na menší. V případě, že je ADAMTS13 nefunkční, velmi velké multimery se uvolňují do krve a za smykového tření se aktivně vážou na krevní destičky. Vzniklé mikrotromby se zachytávají v mikrocirkulaci a mohou způsobit těžké multiorgánové selhání, které je typické pro TTP. Podobné projevy jako TTP mají i jiná onemocnění, proto je správná diagnóza nezbytná pro léčbu, která snižuje riziko úmrtí z 90 % na 10 %. Funkční defekt ADAMTS13 může být vrozený nebo získaný, způsobený protilátkami proti proteináze. Vrozená forma TTP je vzácná a je autosomálně recesivní.

Cílem naší studie bylo zavést metodiku na stanovení vrozené i získané formy TTP. V letech 2003-2004 jsme v naší laboratoři vyšetřili 50 pacientů s podezřením na TTP. Aktivitu ADAMTS13 jsme měřili modifikovanou metodou podle Furlana³. Těžký defekt ADAMTS13 jsme zjistily u 29 pacientů (58 %). U 16 z nich jsme detekovali protilátky proti ADAMTS13, které zapříčinily získanou formu TTP. U 9 pacientů z 10 s vrozenou formou TTP mohla být provedena analýza genu. Přímou sekvenací 29 exonů genu jsme našli u osmi z nich (89 %) inzertní mutaci 4143A (u čtyř pacientů v homozygotní formě) a u dalších tří pacientů mutaci Arg507Gln. Na základě expresních studií bylo prokázáno, že obě mutace jsou kauzální. Rekurence mutace 4143A u šesti nepříbuzných rodin je nezvykle vysoká. Toto zjištění představuje výhodu pro diferenciální diagnostiku dětí se suspektním vrozeným TTP, který má často netypický průběh. Rychlé nalezení kauzální mutace je potom důležitou součástí diagnózy. Možný „founder“ efekt této mutace je předmětem dalšího zkoumání.

LITERATURA

1. Moschowitz E.: *Proceedings of the New York Pathological Society* 24, 21 (1924).
2. Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C., Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., Yang A.Y., Siemieniak D.R., Stark K.R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S.B., Chandrasekaran V., Stabler S.P., Sabio H., Bouhassira E.E., Upshaw J.D., Ginsburg D., Tsai H.M.: *Nature* 413, 488 (2001).
3. Furlan M., Robles R., Lammle B.: *Blood* 87, 4223 (1996).

DERIVÁTY TRIPTYCENU: KARBOXYLOVÉ KYSELINY A JEJICH AMIDY

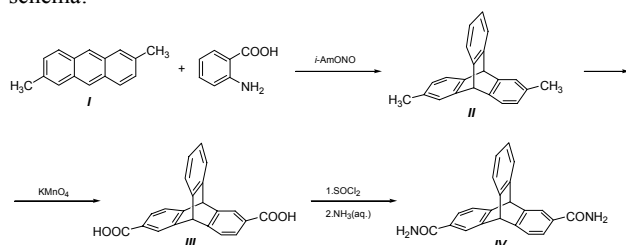
MARKÉTA RYBÁČKOVÁ^a, MARTIN BĚLOHRADSKÝ^a, PETR HOLÝ^a, JIŘÍ ZÁVADA^a a IVANA CÍSAŘOVÁ^b

*^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
rybama@uochb.cas.cz*

Oligokarboxylové kyseliny s triptycenovým skeletem a z nich odvozené amidy jsou zajímavými stavebními prvky

při studiu vodíkovými vazbami řízené supramolekulární výstavby porézních struktur.

Syntéza triptycenyových karboxylových kyselin je založena na Dielsově-Alderově adici benzynu, generovaného z diazotované kyseliny antranilové¹, na methyl-substituované deriváty antracenu. Příklad této syntézy znázorňuje následující schéma:



Rentgenostrukturní analýza monokrystalu racemické dikarboxylové kyseliny **III** potvrdila předpokládanou asociaci molekul prostřednictvím dvojíhých vodíkových mostů mezi karboxylovými skupinami. Molekuly jsou tak v krystalu uspořádány do lineárních řetězců, ve kterých se pravidelně střídají oba enantiomery.

Výzkumný program dále pokračuje snahou o optické štěpení racemické kyseliny **III** a o získání monokrystalu racemické i enantiomerně homogenní formy diamidu **IV**.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087).

LITERATURA

1. Friedman L., Logullo F.M.: J. Org. Chem. 34, 3089 (1969).

IDENTIFICATION OF GENOTOXICITY OF *o*-ANISIDINE AND *o*-NITROANISOLE AND THEIR CARCINOGENIC POTENTIAL FOR HUMANS

HELENA RÝDLOVÁ, MARKÉTA MIKŠANOVÁ, and MARIE STIBOROVÁ

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2
helili@centrum.cz*

2-Methoxyaniline (*o*-anisidine) and 2-methoxynitrobenzene (*o*-nitroanisole) are important pollutants and potent carcinogens for rodents. Using ³²P postlabeling and ¹⁴C- and ³H-labeled *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, respectively, we show that both carcinogens bind covalently to DNA in vitro and in vivo. DNA samples from various organs of Wistar rats, i.p. treated with *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, were analyzed by ³²P-postlabeling. Two DNA adducts, identical to those found in vitro, were detected in urinary bladder, the target organ. These adducts were identified to be deoxyguanosine adducts derived from *o*-anisidine oxidative and *o*-nitroanisole reduction metabolite *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine. Formation of DNA adducts, identical with those formed in rat in vivo, during the *o*-anisidine oxidation and *o*-nitroanisole reduction by human hepatic microsomal and cytosolic samples, respectively, indicates a potential of human hepatic

enzymes to activate these carcinogens in human. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and human xanthine oxidase are responsible for the reductive and oxidative activation of *o*-nitroanisole and *o*-anisidine, respectively. The role of specific cytochrome P450 enzymes in the human hepatic microsomal metabolism of *o*-anisidine was investigated. We attribute most of *o*-anisidine oxidation in human microsomes to CYP2E1. Nevertheless, the participation of CYP1A, 2B6 and 2A6 in its activation cannot be excluded. Utilizing Western blotting and consecutive immunoquantification employing chicken polyclonal antibodies raised against various CYPs, the expression of CYP1A1/2 was found to be strongly induced in rats treated with both compounds. Furthermore, 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation activity, corresponding to both CYP1A1 and 1A2, was significantly increased in rats pre-treated with both carcinogens.

The results of our study, the report on the potential of the human microsomal and cytosolic enzymes to contribute to the activation of *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, strongly suggest a carcinogenic potential of these rodent carcinogens for humans.

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/03/0283).

LASEROVÉ ABLAČNÍ SYNTÉZY S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKCÍ: CESTA K TVORBĚ A IDENTIFIKACI NOVÝCH SLOUČENIN

ONDREJ ŠEDO

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta
Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
sedo@post.cz*

Jedním ze současných trendů anorganické syntézy je kombinace klasických postupů s instrumentálními technikami, ovlivňujícími průběh chemických reakcí například působením ultrazvuku, mikrovln, plazmatu nebo laseru. V této práci byly vyvinuty postupy laserové ablační syntézy spojené se současnou desorpční a ionizací, díky nimž je možné vzniklé sloučeniny identifikovat hmotnostní spektrometrií (instrumentace MALDI-TOF MS). Jako výchozí látky byly využity prvky (S, Se, Te, P, C-grafit, diamant), jednoduché sloučeniny (P₄S₃, P₄S₁₀, SeS₂), či směsi prvků nebo prvků se sloučeninami. Na základě modelování izotopových vzorů bylo v hmotnostních spektrech identifikováno téměř 200 sloučenin doposud nepopsaných v literatuře, jako například 68 nových sulfidů fosforu. Vyššího počtu generovaných sloučenin bylo dosaženo spojením laserové ablace s ultrazvukem. Struktura generovaných sloučenin byla studována sledováním rozpadu za iontovým zdrojem (PSD Post-source Decay). Pro syntézy z prekurzorů ve formě agresivních látek byla vyvinuta technologie grafitových mikrokcelímek umístěných přímo v iontovém zdroji.

Metodologie se ukazuje být vysoce perspektivním postupem pro syntézu celé řady nových a neobvyklých sloučenin, závěry dosavadních studií přispívají i k pochopení některých technologických a analytických postupů.

DIASTEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF [11]HELICENE-LIKE MOLECULES VIA MULTIPLE [2+2+2] CYCLOISOMERIZATION

PETR SEHNAL, IRENA G. STARÁ, ZUZANA ALEXANDROVÁ, IVO STARÝ, and DAVID ŠAMAN

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6
sehnal@uochb.cas.cz*

Molecules possessing helical chirality are being extensively studied because of their proposed applications in catalysis, molecular electronics and material science¹. Very recently, we have developed a novel approach to higher and extended helical scaffolds utilizing multiple CoI-catalyzed [2+2+2] cycloisomerization of aromatic molecules containing six acetylene units. We have also devised a diastereoselective fashion² of the reaction using a centrally chiral hexayne.

The synthesis starts from the known diester **1** that is converted to the tetrayne building block **2** within 5 steps. The Sonogashira coupling of **2** with iodide **3** followed by desilylation gives the key hexayne **4**. The key double [2+2+2] cycloisomerization proceeds under CpCo(CO)₂ catalysis and provides the desired [11]helicene-like compound **5**. The proposed geometry of **5** is shown in Figure 1 (hydrogen atoms are omitted for clarity).

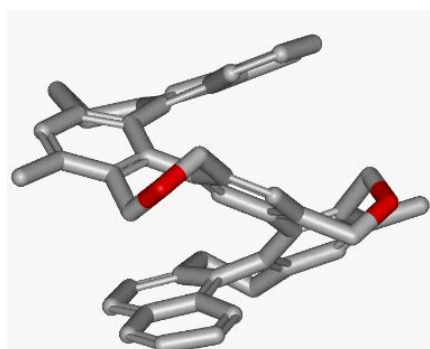
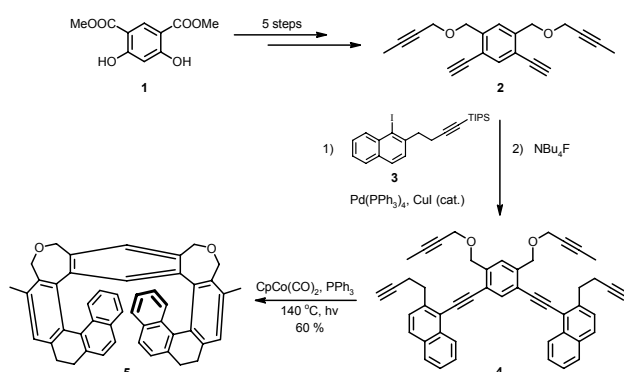


Fig. 1. Proposed geometry of **5**

Supported by the GACR (Reg. No. 203/02/0248) and the IOCB ASCR (Research Project No. Z4 055 905).

REFERENCES

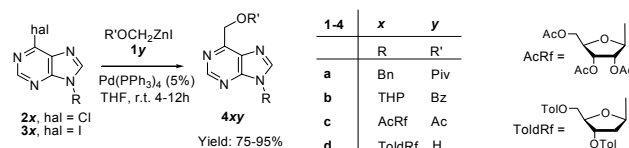
- Urbano A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3986 (2003).
- Stará I.G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšinský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 7, in press (2005).

SYNTÉZA 6-(HYDROXYMETYL)PURÍNŮV POMOCOUP Pd-KATALYZOVANÝCH CROSS-COUPLING REAKCÍ

PETER ŠILHÁR a MICHAL HOCEK

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, Praha 6, 16610
silhar@uochb.cas.cz*

6-(Hydroxymetyl)purín možno vďaka jeho štruktúre považovať za homológ hypoxantínu a ako jeden z potenciálnych inhibítorov adenosín deaminázy¹. Je známe, že 6-hydroxymetyl-9-(β-D-ribofuranozyl)purín, izolovaný z peniazovky škvrnatej (*Collybia maculata*), má antifungálne, cytotoxické a antivirálné (vesicular stomatitis virus) vlastnosti².



Na základe týchto skutočností sme sa snažili vyvinúť novú, lepšiu metodiku na prípravu (hydroxymetyl)purínov. Je všeobecne známe, že prechodným kovom katalyzované cross-coupling reakcie predstavujú veľmi efektívnu techniku na prípravu rôzne substituovaných aromatických, resp. heteroaromatických zlúčenín. Uspeli sme použitím acyloxymetylzinku iodidov (**1y**) v Negishiho Pd-katalyzovaných cross-coupling reakciách s príslušnými 6-halogenpurínmi (**2x**, **3x**). Spomenuté reakcie prebiehali hladko pri laboratórnej teplote za vzniku 6-(acyloxymetyl)purínov (**4xy**) vo veľmi dobrých výťažkoch. Acylové chrániace skupiny je možné odštiepiť katalytickým pôsobením metanolátu sodného v metanole za vzniku žiadaných 6-(hydroxymetyl)purínov. Voľnú modifikovanú purínovú bázu sme pripravili kyslo-katalyzovanou deprotekciovou THP chrániacej skupiny. Pripravený 6-(hydroxymetyl)-9-(β-D-ribofuranozyl)purín vykazuje vysokú cytostatickú aktivitu (IC₅₀=10 nM) a značný inhibičný efekt voči adenosín deamináze.

Touto novou technikou³ je možné pripraviť 6-(hydroxymetyl)purínové bázy, resp. nukleozidy v dvoch krokoch s celkovým výťažkom 75-87 %. Z doterajšieho výskumu regiosektivity týchto reakcií s 2,6-dichlorpurínmi je zrejme, že 6-(hydroxymetyl)-2-chlorpurín je možné pripraviť vo veľmi dobrom výťažku s regiosektivitou rádovo 95/5 – monosubstituovaný/disubstituovaný produkt, čím sa otvára cesta prípravy 2,6-disubstituovaných purínov s rozdielnymi substituentami. Ďalšie funkčné transformácie hydroxylovej

skupiny, ako napríklad halogenácie, oxidácie a na ne nadväzujúce reakcie sú predmetom nášho súčasného výskumu, ktorého výsledky budú tiež prezentované.

Táto práca je časťou výskumného projektu Z4 055 0506, ktorý bol podporovaný GA ČR (čís. grantu 203/03/0035) a firmou Sumitomo Chemical, Co. (Osaka, Japan). Autori ďakujú Dr. Votrubovi za testovanie zlučenin na cytostatickú aktivitu a inhibíciu adenosín deaminázy a Dr. Pohlovi za NMR spektra.

LITERATURA

1. Erion M.D., Reddy M.R.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3295 (1998).
2. Leonhardt K., Anke T., Hillen-Maske E., Steglich W.Z.: *Naturforsch.* 42c, 420 (1987).
3. Šilhár P., Pohl R., Votruba I., Hocek M.: *Org. Lett.* 6, 3225 (2004).

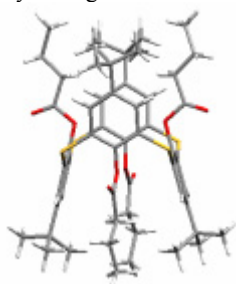
STUDIUM ACYLACE SPODNÍHO OKRAJE THIALICALIX[4]ARENŮ

**MARKÉTA ŠIMÁNOVÁ, PAVEL LHOTÁK,
IVAN STIBOR, HANA DVOŘÁKOVÁ
a MICHAELA POJAROVÁ**

*Ústav organické chemie; VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
simanovm@vscht.cz*

Tato práce je součástí systematického studia reaktivity thiacalix[4]arenů a zabývá se studiem acylací spodního okraje thiacalix[4]arenů.

Acylační reakce byly prováděny s anhydridy nebo chloridy jednoduchých alifatických nebo aromatických organických kyselin v přítomnosti $AlCl_3$ nebo triethylaminu a za katalýzy DMAP. Pro porovnání vlivu objemné *tert*-butylové skupiny na horním okraji thiacalixarenu z hlediska preferenci konformerů byly jako substráty použity 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetrahydroxythiacalix[4]aren a jeho *de-tert*-butylovaný analog.



Acylace za výše uvedených podmínek vedly převážně ke vzniku di- a tetraacylovaných thiacalix[4]arenů v různých konformacích (cone, 1,3-alternate), které byly identifikovány pomocí 1H NMR spektroskopie. Konformace některých připravených derivátů byla také potvrzena v pevném stavu pomocí rentgenostrukturní analýzy.

Experimentální výsledky potvrdily efektivnost DMAP jako katalyzátoru pro acylace spodního okraje thiacalix[4]arenů.

LITERATURA

1. Lhoták P.: *Eur. J. Org. Chem.* 8, 1675 (2004).
2. Gutsche C. D.: *Calixarenes, Monographs in Supramolecular Chemistry*, Vol. 1, (Stoddart J. F., ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
3. Gutsche C. D.: *Calixarenes Revisited, Monographs in Supramolecular Chemistry* (Stoddart J. F., ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
4. Kumar S., Chabla H. M., Varadarajan R.: *Tetrahedron Lett.* 43, 2495 (2002).

CHARACTERISATION OF MOLECULARLY IMPRINTED MONOLITHIC COLUMNS

JAKUB ŠIRC^{a,b}, Z. BOSÁKOVÁ^a, and J. MICHÁLEK^b

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, ^bInstitute of Macromolecular Chemistry, AS CR, Heyrovsky sq. 2, 162 06 Prague 6

Molecularly imprinted polymers have received much attention in various fields because of their high selectivity for target molecules. It has been recognized as a promising technique, where the molecule to be detected is added to a reaction mixture of a cross-linker, a solvent, an initiator and a functional monomer that possesses a functional groups capable of interacting with the target molecule. Binding sites in the resultant polymers involve functional groups, which are constructed according to the shape and chemical properties of the target molecules. After removal of the target molecules, these specific binding sites exhibit high selectivity and affinity for the template molecules.

Monolithic HPLC stationary phases based on molecular imprinting were prepared by *in situ* polymerization. The template compound (L-tosylphenylalanine), the functional monomer (methacrylic acid), the cross-linker (ethylene glycol dimethacrylate), the initiator (azobisisobutyronitrile or hydroxydimethylacetophenone) and a porogen mixture (dodecanol with cyclohexanol or toluene) were placed in glass columns (150 × 3 mm i.d.) and heated or irradiated to induce polymerization.

Newly prepared monolithic columns were tested on HPLC separations of enantiomer pairs of derivatized amino acids and a standard mixture of hydrophobic solutes. The structure of the monoliths was investigated by scanning electron microscopy and nitrogen/mercury porosimetry. The dependences of the polymer morphology and the chromatographic behavior on the composition of the polymerization mixture and on the polymerization conditions were also investigated.

We would like to thank the Ministry of Education, Youth and Physical Training of the Czech Republic, Grant No. 908/2005 and Academy of Sciences of the Czech Republic, project AVOZ 40500505 for financial support.

MODIFIKACE ORGANOKŘEMIČITÝCH KONSOLIDANTŮ KAMENE

MARKÉTA ŠKRDLANTOVÁ a PETR KOTLÍK

*Ústav chemické technologie restaurování památek, VŠCHT
Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
marketa.skrdlantova@vscht.cz*

Organokřemičité sloučeniny patří v současné době mezi hojně používané konsolidanty pro kámen, historické omítky památkových objektů atd. Konečným produktem jejich vytvrzování je prostorová polymerní síť (gel), tvořená především atomy křemíku a kyslíku. Samotné čtyřfunkční monomery (tetraalkoxysilany) tvoří při polymeraci pevnou polymerní síť s krátkými vzdálenostmi mezi jednotlivými uzly. Tato síť je dosti křehká.

Proto se objevují snahy modifikovat výchozí látky tak, aby vznikl méně křehký, elastičtější gel. Výhodnějších mechanických vlastností – nižší křehkosti a větší houževnatosti gelu – je obecně možno docílit prodloužením meziuzlových vzdáleností v síti. Jednou z možností, jak naměkčení polymerní sítě dosáhnout, je prodloužení úseků mezi uzly sítě zabudováním dvoufunkčních, popřípadě trojfunkčních monomerních esterů. Tuto možnost studuje tato práce.

K modifikaci základní sítě tetraethoxysilanu (TEOS) byly použity dva monomery – dimethyldiethoxysilan (DMDEOS) a methyltriethoxysilan (MTEOS). Při přípravě konsolidačních směsí byly použity dva základní typy katalýzy – kyselá katalýza kyselinou chlorovodíkovou nebo neutrální katalýza organokovovým katalyzátorem (dibutyl-bis-[1-oxo-(dodecyl)oxy]stannan, zkráceně dibutylcindilaurát – DBCDL).

Pozorovat změnu vlastností polymerní sítě přímo v kameni lze vzhledem k nehomogenitě přírodní horniny jen velmi obtížně. Proto bylo pozorováno chování organokřemičitých esterů (konsolidačních směsí) mimo přírodní materiál – na modelových směsích umělého kamene.

V těchto směsích jako pojivo byly použity modifikované konsolidační směsi, jako plnivo byla použita směs středně umletého křemene a písku. U modelových směsí byly sledovány některé fyzikálně mechanické vlastnosti (pevnost v tahu za ohybu, pevnost v tlaku, modul pružnosti v tlaku, nasákavost vodou po 48 hodinách a odolnost krystalizaci solí). Struktura modelových směsí umělého kamene byla sledována NMR spektroskopii.

Množství a funkčnost modifikátoru a typ katalyzátoru v pojivu mají značný vliv na mechanické vlastnosti modelových směsí umělého kamene. Modifikací TEOS dvoj- a trojfunkčním alkylalkoxysilanem se mění charakter vzniklého polymerního produktu, dochází ke snížení hustoty polymerní sítě a tím ke snížením hodnot modulů pružnosti a změně pevností v tahu za ohybu a v tlaku. Obecně je v případě kyselých katalýz dosahováno vyšších pevností než v případě neutrální katalýzy.

CHIRAL BAEYER-VILLIGER OXIDATION OF FUNCTIONALIZED CYCLOHEXANONES

**RADKA ŠNAJDROVÁ, M.D. MIHOVILOVIC*,
and A. ČEJKOVÁ**

*Laboratory of Applied Biology and Bioengineering, Institute of
Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6,
*Institute of Applied Synthetic Chemistry, Vienna University of
Technology, Vienna, Austria
snajdror@yahoo.com*

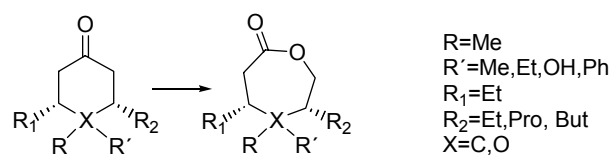
Enzyme mediated Baeyer-Villiger oxidations offer an efficient and highly selective access to chiral lactones as a building blocks of a variety of natural products and bioactive compounds.

With recent progress in genomics, a large variety of flavin dependent monooxygenases, which catalyse this biotransformations, is becoming available. These enzymes exhibit different substrate specificity and enantioselectivity. This is a prerequisite for the development of a toolbox of catalytic entities, which will be available to synthetic chemists to solve their specific problems.

In order to simplify possible applications by preparative chemists, we utilize recombinant whole-cell systems, which produce the required enzyme in substantial quantities and also carry out recycling of all required cofactors.

We synthesised various cyclohexanones bearing different functional groups. Such precursors were used for subsequent microbial Baeyer-Villiger reactions (Scheme 1). Substrate profiling involved some of 10 different expression systems for Baeyer-Villigerases from various natural sources.

Substrate profiling using a set of representative precursors is currently the only way to gain insight into geometry of the active sites of such monooxygenases, since no crystallographic data is available, yet. Chemometric analysis of substrate acceptance and enantioselectivity of the biotransformation can deliver a “super-substrate” model for the monooxygenases.



Scheme 1

This project is supported by FWF (Austrian Science Fund, Project No I19-B10).

LASEROVÁ ABLAČNÍ SYNTÉZA S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ PRO GENEROVÁNÍ A SOUČASNOU ANALÝZU NOVÝCH LÁTEK; JE EXISTENCE FULLERENOVÝCH KLASTRŮ ARSENU REÁLNÁ?

ZBYNĚK ŠPALT

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta
Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
spalt@mail.muni.cz

Laserová ablační syntéza (LA-TOF-MS) je rychlá a citlivá metoda využívající desorpci a ionizaci vzorku spojenou s detekcí vzniklých species hmotnostní spektrometrií vhodná zejména k identifikaci stopových nečistot v pevných vzorcích anorganického původu. V této práci byla studována možnost tvorby arsenových analogů fullerenu a LA-syntézy nových As sulfidů. Laserovou ablací kovového As (čistota 99.997 %) byly generovány klustry As_n ($n = 2-7$), tvorba klastrů As_n ($n = 20, 60$) fullerenového typu předpokládána kvantově-chemickými výpočty nebyla za daných experimentálních podmínek potvrzena. V další části práce byly jako prekursory pro laserovou ablační syntézu použity sulfidy arsenu As_2S_2 , As_2S_3 , As_2S_5 a jejich směsi se sírou. Bylo generováno velké množství různých sulfidů arsenu (AsS , AsS_3 , As_2S , As_2S_2 , As_2S_3 , As_2S_5 , As_2S_7 , As_3S , As_3S_4 , As_4S_3 , As_4S_4), jejichž stechiometrické složení bylo určeno na základě izotopového modelování. Vůbec poprvé bylo popsáno následujících třináct zcela nových sulfidů arsenu: AsS_2 , AsS_4 , AsS_5 , AsS_6 , AsS_7 , AsS_8 , As_2S_4 , As_2S_6 , As_3S_2 , As_3S_3 , As_3S_5 , As_3S_6 , As_3S_7 . Laserová ablace se ukázala jako vhodná metodika pro syntézu nových látek.

CYTOKININOVÉ RECEPTORY *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 A AHK3; OD LIGANDOVÉ SPECIFITY K VÝVOJI SPECIFICKÉHO INHIBITORU

LUKÁŠ SPÍCHAL a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky,
Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc
spichy@post.cz

Cytokinininy jsou rostlinné hormony ovlivňující základní procesy růstu a vývoje rostlin. K porozumění jejich molekulárního mechanismu účinku, jako signálních molekul, výrazně přispěla až identifikace genů kódujících specifické membránové receptory v *A. thaliana*^{1,2}.

K molekulární charakterizaci cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 a AHK3 byl využit Δ rcs a cps::lacZ mutantní bakteriální kmen *E. coli* exprimující tyto receptory. Oba receptory jsou citlivější k bazím isoprenoidních cytokininů, méně k aromatickým cytokininům. CRE1/AHK4 receptor je vysoce specifický a je citlivý pouze k bazím isoprenoidních cytokininů. AHK3 receptor navíc rozpoznává cis-zeatin, považovaný za neaktivní isomer, a také ribosidy isoprenoidních cytokininů. Rozdíly ve specifitě a citlivosti obou receptorů mohou mít souvislost s jejich rozdílným

výskytem v rostlinných orgánech. V biotestu s ARR5::GUS semenáčky *A. thaliana* byly aktivní i ostatní formy cytokininů. Vysvětlením může být metabolická aktivita, které podléhají cytokinininy v rostlinném organismu³.

Některé pyrolo- a pyrazolo-pyrimidiny byly na základě jejich antagonistického účinku a strukturní podobnosti s cytokinininy klasifikovány jako specifické anticytokinininy s účinkem na receptorové úrovni⁴. Tyto látky však nekompetují s radioaktivně značeným cytokininem na CRE1/AHK4 a AHK3 receptoru, ale působí jako inhibitory cyklin-dependentních kinas. Systematické testování látek odvozených od cytokininů v bakteriálním receptorovém testu a na izolovaných membránách obsahujících cytokininové receptory vedlo k objevu prvního specifického inhibitoru cytokininových receptorů⁵. Látka PI-55 je pro svůj antagonistický účinek v současné době dále zkoumána v naší laboratoři.

LITERATURA

- Inoue T., Higushi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T.: *Nature* 409, 1060 (2001).
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T.: *Plant Cell Physiol.* 42, 107 (2001).
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Strnad M., Romanov G.A., Schmölling T.: *Plant Cell Physiol.* 45, 1299 (2004).
- Iwamura H., v knize: *Cytokininins. Chemistry, Activity and Function* (Mok D.W.S., Mok M.C., ed.), str. 45. CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Spíchal L., Kryštof V., Lenobel R., Popa I., Stýskala J., Binarová P., Cenklová V., Kontopidis G., Fischer P.M., Schmölling T., Strnad M.: *Nat. Cell Biol.*, odesláno.

FLUOROVANÉ SILYL CYKLOPENTADIENYLOVÉ KOMPLEXY – POTENCIÁLNÍ KATALYZÁTORY PRO FLUOROVOU DVOUFÁZOVOU KATALÝZU

LUCIE ŠTASTNÁ^a, JAN SÝKORA^a, IVANA ČÍSAŘOVÁ^b a JAN ČERMÁK^a

^aÚstav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ^bKatedra anorganické chemie PŘF UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
stastna@icpf.cas.cz

Fluorová dvoufázová katalýza využívá výhod homogenní a heterogenní katalýzy, při reakci je katalyzátor homogenní a při separaci je specificky rozpustný ve fluorové fázi, zatím co produkty jsou v organické fázi.

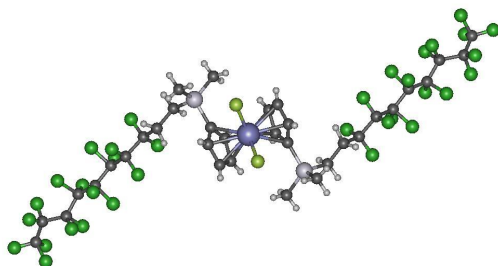
Cyklopentadienylové komplexy našly široké uplatnění v homogenní katalýze, avšak v literatuře je jen několik zmínek o jejich modifikaci pro fluorovou dvoufázovou katalýzu¹⁻⁴.

Podávalo se připravit 8 různě substituovaných cyklopentadienů. Elektron-odtahující vlastnosti perfluorovaného ohonu u takto připravených prekursorů ligandů jsou odstíněny nefluorovanou mezerou – dimethylsilylethandiylovou skupinou. Bylo pozorováno silné fluxionální NMR chování jak v ¹H tak ¹³C spektrech. Fluorofilní vlastnosti

některých připravených cyklopentadienů byly porovnány s fluorovanými cyklopentadieny známými z literatury^{2,3}.

Cyklopentadienové ligandy prekurzorů byly použity k přípravě titaničitých komplexů s jedním nebo dvěma cyklopentadienylovými kruhy⁵. Byly stanoveny jejich rozdělovací koeficienty pro fluorový dvoufázový systém. Podařilo se i připravit rhodný komplex, který byl bohužel znečištěn neznámou látkou.

Všechny připravené látky byly identifikovány NMR spektroskopii a jeden dichlorotitanocen byl získán v krystalické formě a tudíž byla určena jeho struktura viz. obr.1. Kvůli přehlednosti jsou zobrazeny pouze ty fluorové atomy, které mají v neuspořádaném fluorovaném řetězci největší obsazovací faktory.



Obr. 1: Projekce krystalové struktury bis(perfluoroktyl)-ethylsilylcyklopentadienyldichloro titaničitého komplexu

Nefluorovaná dimethylsilylethandiylová skupina zvýšila fluorofilitu cyklopentadienů. Připravené fluorované dichlorotitanoceny budou dále testovány jako prekursory katalyzátorů pro hydrogenační reakce.

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou ČR (IAA 4072203).

LITERATURA

- Hughes R.P., Le Husebo T.: *Organometallics* 16, 5 (1997).
- Čermák J., Auerová K., Nguyen H.T.T., Blechta V., Vojtíšek P., Kvičala J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 382 (2001).
- Kvičala J., Bříza T., Paleta O., Auerová K., Čermák J.: *Tetrahedron* 58, 3847 (2002).
- Dinh L.V., Gladysz J.A.: *Chem. Commun.* 8, 998 (2004).
- Čermák J., Šťastná L., Sýkora J., Císařová I., Kvičala J.: *Organometallics* 23, 2850 (2004).

ROLE *Ato* TRANSPORTÉRŮ V AMONIAKOVÉ SIGNALIZACI *S. cerevisiae*

DITA STRACHOTOVÁ, LIBUŠE VÁCHOVÁ a ZDENA PALKOVÁ

Mikrobiologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4-Krč

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, na pevném podkladu jsou ale schopny vytvářet organizované

struktury, kolonie. Kolonie jsou specifické pro daný druh a kmen a v jistých ohledech mohou připomínat mnohobuněčné organismy.

Při sledování vývoje kvasinkových kolonií v čase bylo zjištěno, že kolonie periodicky mění pH svého okolí z acidického na alkalické a naopak. Pro acidickou fázi je typický růst kolonií, zatímco v alkalické fázi je růst přechodně inhibován. Přepnutí z acidické do alkalické fáze je spojeno s produkcí amoniaku, který funguje jako signál mezi sousedními koloniemi a který ovlivňuje periodicitu přepínání. Jedním z důsledků amoniakové signalizace je inhibice růstu kolonie na straně přivrácené ke koloniím sousedním a její expanze do volného prostoru. Celkový počet přepnutí závisí na množství živin a prostoru, který je k dispozici¹. Přepínání vývojových fází a produkce amoniaku jsou známy nejen u *Saccharomyces cerevisiae*, ale i u dalších druhů kvasinek, jako jsou například *Candida mogii* nebo *Rhodotorula glutinis*². Studium dlouhodobého vývoje kvasinkových kolonií by mohlo pomoci pochopit způsob přežívání mikroorganismů v přirozených podmínkách.

V důsledku přijetí amoniakového signálu dochází v buňkách kolonie k mnoha změnám v expresi proteinů. Tyto změny byly u *S. cerevisiae* zjišťovány sledováním transkriptomových změn metodou DNA čipů. Data z analýz využívajících DNA čipy a další experimentální data získaná v naší laboratoři nasvědčují, že za produkci amoniaku do okolí by mohly být zodpovědné tři homologní proteiny kódované geny *ATO1* (*YNR010c*, *ADY2*), *ATO2* (*YNR002c*, *FUN34*) a *ATO3* (*YDR384c*)³. Ve své práci jsem se zaměřila na změny produkci a lokalizace uvedených proteinů na pevném médiu, ve statických a aerobně kultivovaných kulturách.

Práce je podporována z grantů GA ČR: 204-05-0294 a GAČR: 204-03-H066.

LITERATURA

- Palkova Z., Janderova B., Gabriel J., Zikanova B., Pospisek M., Forstova J.: *Nature* 390, 532 (1997).
- Palková Z., Forstová J.: *J. Cell. Sci.* 113, 1923 (2000).
- Palkova Z., Devaux F., Ricicova M., Minarikova L., Le Crom S., Jacq C.: *Mol. Biol. Cell* 13, 3901 (2002).

RESTRIKČNÍ MAPOVÁNÍ GENOMŮ BLÍZCE PŘÍBUZNÝCH SPIROCHET RODU *TREPONEMA*

MICHAL STROUHAL a DAVID ŠMAJS

Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Tomešova 12, Brno 602 00
strouhal@med.muni.cz, dsmajs@med.muni.cz

Provedli jsme restriční mapování genomů pěti příbuzných treponemálních kmenů zahrnující *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols, *T. pallidum* subsp. *pallidum* SS14, *T. pallidum* subsp. *pertenue* Samoan D, *T. pallidum* subsp. *pertenue* Gauthier a *T. paraluisancuniculi*. *T. pallidum* subsp. *pallidum* je etiologickým agens sexuálně přenosné syfilis a je obligátním patogenem člověka, *T. pallidum* subsp. *pertenue* vyvolává endemické nevenerické treponemální infekce

tropických a subtropických oblastí, *T. paraluiscuniculi* způsobuje venerické onemocnění králíků a není infekční pro člověka. Lze předpokládat, že různá míra invazivity a patogenity těchto spirochet se bude odrážet v rozdílech jejich genomů. Genom *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols, kompletně sekvenovaný r. 1998, byl rozdělen do 87 vzájemně se překrývajících oblastí (TPI intervaly) a pro každou oblast byla navržena kombinace příslušných primerů. Každý z těchto intervalů byl pomocí XL PCR amplifikován u všech studovaných kmenů a získané PCR produkty byly štěpeny restriktčními enzymy *Bam*H I, *Eco*R I a *Hind* III. Takto získaný restriktční profil byl použit k determinaci heterologních úseků DNA jednotlivých treponemálních kmenů.

Odlíšná cílová restriktční místa byla u *T. paraluiscuniculi* nalezena na 34 místech (16 pro *Bam*H I, 5 pro *Eco*R I a 13 pro *Hind* III), z toho bylo 21 nově vzniklých restriktčních míst a 13 zaniklých; u kmene Samoan D bylo nalezeno 8 odlišných cílových restriktčních míst (1 pro *Bam*H I, 2 pro *Eco*R I a 5 pro *Hind* III), z toho bylo 5 nově vzniklých a 3 zaniklá. U kmenů Gauthier a SS14 bylo nalezeno 1 místo s odlišným restriktčním profilem pro *Hind* III. U *T. paraluiscuniculi* bylo nalezeno sedm delecí v oblastech TPI8, TPI12, TPI13, TPI34, TPI41, TPI48 a TPI66 a 3 inzerce v TPI2, TPI32B a TPI78. U kmenů Samoan D, Gauthier a SS14 byly nalezeny dvě delece v oblastech TPI13 a TPI34 a jedna inzerce v oblasti TPI12; u kmene Samoan D byla navíc nalezena delece v oblasti TPI78. Delece v TPI12 o velikosti 1,8 kb zahrnuje geny o neznámé funkci a nachází se v oblasti genu *tprD* (TP0131). Delece v TPI48 je velká 1,7 kb a zahrnuje geny *tprI* (TP0620), *tprJ* (TP0621) a geny kódující proteiny o neznámé funkci (TP0617 - TP0619). Delece v TPI78 u kmene Samoan D je přibližně 350 bp velká a nachází se v oblasti genu *tprL* (TP1031). Inzerce v oblasti TPI12 je velká přibližně 1300 bp a nachází se v oblasti genů TP0126 - TP0130; u *T. paraluiscuniculi* jsou inzerce velké přibližně 150 bp a nebyly zatím přesně charakterizovány.

Výsledky naznačují vysokou míru sekvenční homologie mezi vyšetřeny kmeny. Ačkoliv je patogenita studovaných treponemálních kmenů různá, nebyly zjištěny zásadní rozdíly mezi srovnávanými genomy. Ukazuje to na možnost, že rozdílná virulence treponemálních kmenů je podmíněna relativně malými odlišnostmi v příslušných genomech. Tyto odlišnosti jsou soustředěny zejména ve skupině genů *tpr*, 12-ti genech specifických pro *T. pallidum* o zatím neznámé funkci. Identifikovaných nukleotidových záměn lze využít při molekulární identifikaci treponemálních kmenů.

Podporováno granty IGA MZ ČR č. NF NI/7351-3 a GA ČR č. 310/04/0021.

***E. coli* EXPRESSION, PURIFICATION AND BINDING STUDIES OF GALECTIN-4**

VERONIKA SUCHÁ^a, GABRIELA JENÍKOVÁ^b, VLADIMÍRA MARKOVÁ^b, MILAN FABRY^a, PETR MALÝ^b, and JIŘÍ BRYNDA^a

^aDepartment of Recombinant Expression and Structural Biology, Institute of molecular genetics, Flemingovo nám. 2,

166 37 Praha 6, ^bDepartment of Molecular Glycobiology, Institute of molecular genetics, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Galectins belong to a family of carbohydrate-binding proteins that share conserved amino acid sequences and affinity for β -galactoside sugars.

Galectin-4 is a monomer of about 36 kDa containing two carbohydrate-binding domains (CDR1 and CRD2, 40% identical) within a single polypeptide chain². This protein is expressed only in the alimentary tract, from the tongue to the large intestine. Strong expression of galectin-4 can be induced in cancers from other tissues including breast and liver. This distinct induction can make a valuable diagnostic marker and target for the development of inhibitory carbohydrate-based drugs.

Galectins may also bind intracellular non-carbohydrate ligands and have intracellular regulatory roles in processes such as RNA splicing, apoptosis, and, as suggested most recently, the cell cycle³.

The exact function of galectin-4 has not been exactly found out yet. Full-length mouse galectin-4 and its respective carbohydrate recognition domains CRD1 and CRD2 were expressed in *E. coli* and consecutively purified. Lactose-binding affinity of CDR1 was determined by fluorescence assay based on fluorescence quantum yield of two tryptophan residues (Trp 62, Trp 75) located on opposite borders of the binding site.

Specificity of recombinant galectin-4 and its respective carbohydrate recognition domains CRD1 and CRD2 labeled with FITC was determined using a glycan array consisting of synthetic and natural carbohydrates attached to microtiter plates.

REFERENCES

1. <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/main.shtml>
2. Gitt M.A., Colnot C., Poirier F., Nani K.J., Barondes S.H., Leffler H.: *J. Biol. Chem.* 273, 2954 (1997).
3. Huflejt M.H., Leffler H.: *Glycoconjugate J.* 20, 247 (2004).

TRANSGENNÍ ROSTLINY PRO ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI FYTOREMEDIACE PCB A TOLUENU

MARTINA SURÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^{a,b}, MIKLOS SZEKERES^c, MICHAL SYLVESTRE^d, ZUZANA CHRASTILOVÁ^a a TOMÁŠ MACEK^{b,a}

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT, Technická 3, 16628 Praha, ^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 16610 Praha, ^cInstitute of Plant Biology, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, P. O. Box 521 H-6701 Szeged, Hungary, ^dINRS-Quebec, Pointe-Claire, H9R 1G6, Quebec, Canada

Odstraňování polutantů z životního prostředí je často prováděno fyzikálně-chemickými postupy, které jsou většinou velmi finančně nákladné. Snaha o nalezení levnější metody

vedla k myšlence využití fyto-remediace rostlin. Cílem této práce je zvýšení účinnosti rostlin metabolisovat některé organické polutanty jako jsou polychlorované bifenyly (PCB) a toluen. Pro tento účel byl navrhnout postup přípravy transgenních rostlin, které by měly ve svém genomu obsahovat geny potřebné k degradaci PCB nebo toluenu.

Byl vybrán bakteriální gen *bphC*, který je součástí metabolické dráhy degradace PCB bakterie *Comamonas testosteroni* B-356. Enzym 2,3-dihydroxybifenylyl-1,2-dioxygenasa, kódovaný genem *bphC*, je odpovědný za rozštěpení bifenylového kruhu. Tento důležitý krok, který je u rostlin limitující v procesu biodegradace PCB, by mohlo podpořit klonování bakteriálního *bphC* do rostlinného organismu. Pro snadnější detekci exprese genu *bphC* byly navrženy různé konstrukty s kazetami obsahující gen *bphC* ve fusi s genem pro GFP („green fluorescent protein“), GUS (beta-glukuronidasu) a LUC (luciferasu). Byl navržen také konstrukt, který obsahuje gen *bphC* s histidinovou kotvou (6x His), jež umožňuje snadnou izolaci proteinu z rostlinného organismu. Jako modelové rostliny byly vybrány *Nicotiana tabacum* a *Arabidopsis thaliana*. Pro transformaci rostlin pomocí agrobakteriální infekce bylo připraveno šest konstruktů: pPCV702/CaMV35S/*bphC*/GFP (tři různé konstrukty), pPCV812i/CaMV35S/*bphC* (obsahující GUS gen), pPCV/LUC+-NOS/CaMV35S/*bphC* (obsahující LUC gen) a pPCV812i(-GUS)/CaMV35S/*bphC*/His. Transformované rostliny *Nicotiana tabacum* byly selektovány na médiu s antibiotikem. V rostlinách s CaMV35S/*bphC*/GFP byla přítomnost dané DNA i RNA ověřena se specifickými primery metodou PCR, popř. RT-PCR. Expresí fusního proteinu BphC/GFP byla dokazována imunochemicky s protilátkami proti proteinům BphC a GFP.

Konstrukt obsahující gen *bphC* ve fusi s genem pro luciferasu byl transformován do rostlin *Arabidopsis thaliana*. Přítomnost klonované DNA byla ověřena se specifickými primery metodou PCR. Byla zaznamenána také luminescence exprimované luciferasy v rostlinách *Arabidopsis thaliana*.

Gen *todC1C2* kóduje enzym toluendioxygenasu, která katalyzuje oxidaci aromatického kruhu toluenu a poskytuje tak substrát pro následnou biodegradaci. Byly připraveny dva genetické konstrukty, jeden obsahující gen *todC1* s histidinovou kotvou a druhý pouze s genem *todC2*. Tyto geny budou exprimovány v rostlinných buňkách transienční expresí, která zajišťuje rychlou odpověď na otázku aktivity exprimované toluendioxygenasy *in vivo*.

Tato práce byla sponzorována grantem MŠMT ČR č. IPO5ME745.

EFFECT OF METHYLATED ANTHRACENE DERIVATIVES ON RAT LIVER EPITHELIAL CELLS

LENKA ŠVIHÁLKOVÁ ŠINDLEROVÁ^{a,b}, LENKA UMANNOVÁ^{a,b}, JAN VONDRÁČEK^a, KATEŘINA CHRÁMOSTOVÁ^a, JIŘÍ NEČA^c, KATEŘINA PĚNČÍKOVÁ^c, MILAN ČÍŽ^d, ANTONÍN LOJEK^d, ALOIS KOZUBÍK^a, BRAD L. UPHAM^e, and MIROSLAV MACHALA^c

^aLab. Cytokinetics, Inst. Biophysics, AS CR, Kralovopolska 135, 612 65 Brno, ^bRECETOX, Fac. Sci., Masaryk Univ., Kamenice 126/3, 625 00 Brno, ^cVeterinary Res. Inst., Hudcova 70, 62132 Brno, ^dLab. Free Radical Pathophysiology, Inst. Biophysics, AS CR, Kralovopolska 135, 61265 Brno, ^eDept Paediatrics & Human Development, Michigan State Univ., B420 Life Sciences, East Lansing, MI 48824, USA *sindler@ibp.cz*

The methylated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons are important environmental pollutants that are also found at high levels in cigarette smoke. Methylated anthracenes are present in cigarette smoke in concentration 60-fold higher than benzo(a)pyrene¹. It has been hypothesized that they could play a role in tumour promoting effects of cigarette smoke condensates, such as inhibition of gap junctional intercellular communication (GJIC), an epigenetic event involved in the removal of an initiated cell from growth suppression. The position of methyl group has been shown to significantly affect the biological effects of methylated anthracenes on GJIC inhibition in rat liver epithelial cells, as the compounds with substitution forming bay-like region have been shown to inhibit GJIC and activate mitogen-activated protein kinases². Moreover, it has been recently shown that 1-methylanthracene (1-MeA) can induce a release of 3H-arachidonate and apoptosis in endothelial cells by a mechanism that involves activation of phospholipase A2 (ref.³). Arachidonic acid (AA)-induced cell death is often associated with oxidative stress, although a causal relationship has not yet been made.

In the present study, we investigated effects of methylated anthracenes on the release of AA, formation of reactive oxygen species (ROS), GJIC inhibition, ERK1/2 activation, induction of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated activity and cytokinetics in rat liver epithelial WB-F344 cells, a cellular model used for studies on tumour promoting effects of xenobiotics. We found that 1-MeA and 9-MeA, both carrying methyl substitution forming a bay-like region, inhibited GJIC in concentration-dependent manner and stimulated a rapid and transient ROS formation, detected by lucigenin-dependent chemiluminescence. Contrary to that, 2-MeA failed to inhibit GJIC and induce ROS production. Also, 1-MeA and not 2-MeA induced a release of AA from WB-F344 cells assessed by HPLC and activation of ERK1/2 (p44^{MAPK}/p42^{MAPK}). No compound was cytotoxic at the range up to 100 μM concentration and they did not affect cell proliferation in confluent WB-F344 cells. All three compounds induced only a weak AhR-mediated activity.

Taken together, our data seem to suggest that bay-like methylated anthracenes can inhibit GJIC and induce AA release, but also stimulate ROS formation. These rapid effects were not associated with modulation of cell proliferation and cell death, however they might be associated with GJIC inhibition, an important tumour-promoting process, and/or perturbation of intracellular lipid signalling. Future studies should investigate the exact mechanisms of ROS formation and AA release control, as both ROS and AA can play a significant role in modulation of cell signalling and cytokinetics.

This work was supported by grant No. 524/05/0595 of Grant Agency of the Czech Republic and Ministry of Agriculture (grant No. MZE 0002716201).

REFERENCES

- Severson R. F., Snook M. E., Higman H. C., Chortyk O. T., Akin F. J., in: *Carcinogenesis* (Freudenthal R. I., Jones P. W., ed.) Raven Press, New York, 1, 269 (1976).
- Rummel A. M., Trosko J. E., Wilson M. R., Upham B. L.: *Toxicol. Sci.* 49, 232 (1999).
- Tithof P.K., Elgayyar M., Cho Y., Guan W., Fisher A.B., Peters-Golden M.: *Faseb J.* 16, 463 (2002).

DESIGN A SYNTÉZA NOVÝCH TYPŮ EXTRAKTANTŮ KOVŮ NA BÁZI LIGANDOVÝCH TENZIDŮ

EVA SVOBODOVÁ

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
svobodoe@vscht.cz

V naší skupině byly dříve připraveny lipofilní ligandy **I** a **II** obsahující 2-(hydroxyiminomethyl)pyridinové chelotvorné seskupení, jejichž extrakční účinnost byla testována měřením jejich schopnosti transportovat ionty přechodných kovů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Pd^{2+}) přes chloroformovou kapalnou membránu (model BLM – bulk liquid membrane). Bylo zjištěno, že přítomnost kvartérní amoniové skupiny zvyšuje rychlost transportu, její struktura (počet a délka alkylových řetězců) ovlivňuje rychlost a selektivitu transportu. Méně lipofilní nekvartérní alkyl(pyridin-2-yl)ketoximy **I** transportují přes kapalnou membránu kromě iontů mědi také nikelnaté kationy, přičemž rychlost transportu Ni^{2+} významně klesá s rostoucí délkou alkylového řetězce. Kvartérní amoniové soli **II** vykazují vyšší selektivitu vůči transportovaným kovům. Zatímco měďnaté ionty byly pomocí ligandů **II** transportovány velmi účinně, nikelnaté ionty jimi transportovány nejsou. Nosiče **II** rovněž účinně transportovaly paladnaté ionty^{1,2}.

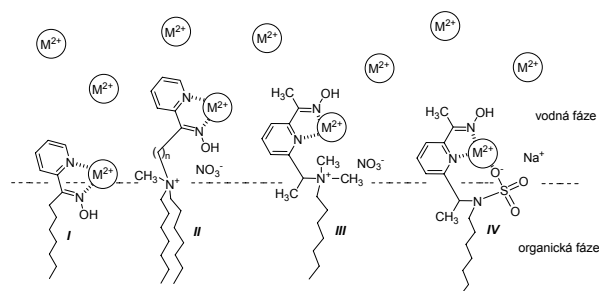


Schéma 1

Z literatury³ je známo, že elektrostatická interakce mezi záporně nabitým povrchem anionické micely a iontem kovu pozitivně ovlivňuje koordinaci tohoto iontu kovu k ligandu zabudovanému v micelě. Lze tedy předpokládat, že přítomnost anionické skupiny v molekule nosiče bude pozitivně ovlivňovat rychlost koordinace iontu kovu na fázovém

rozhraní a tedy i rychlost transportu. Proto byly navrženy a připraveny nové typy kationických **III** a anionických **IV** ligandů se stejným chelotvorným seskupením (Schéma 1). Porovnáním průběhů transportů různých iontů přechodných kovů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} , Cd^{2+}) pomocí ligandů **III** a **IV** bude posouzen vliv záporného náboje na transportní chování ligandu.

LITERATURA

- Cibulka R., Hampl F., Šmidrkal J. Jr., Liška F.: *Tetrahedron Lett.* 40, 6849 (1999).
- Svobodová E., Cibulka R., Šmidrkal J. Jr., Liška F., Hampl F.: *10th International Conference Separation of Ionic Solutes, Podbanské High Tatras, 6-11 Sept. 2003, Book of abstracts* (Kuruc J., ed.), str. 93.
- Son S. - G., Hebrant M., Tecilla P., Scrimin P., Tondre Ch.: *J. Phys. Chem.* 96, 11072 (1992).

PŘESNĚ DEFINOVANÉ PYRIDINIOVÉ OLIGOMERY A JEJICH DERIVÁTY VYUŽITELNÉ V MOLEKULOVÉ ELEKTRONICE

MICHAL VALÁŠEK^{a,b}, JAROSLAV PECKA^a a JOSEF MICHLE^b

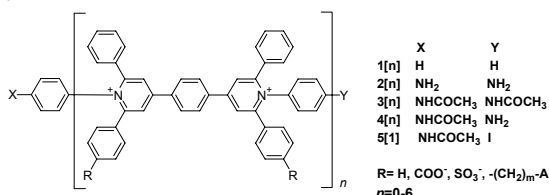
^aKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2,
^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO80309-0215, U.S.A.
michalvalasek@hotmail.com

Poslední desetiletí se zájem chemie ubírá k novým materiálům využitelným v molekulové elektronice. Námi připravené oligomery slouží jako konstrukční články v molekulárně elektronických obvodech, ve kterých dochází k přenosu negativního náboje (elektronů) pomocí oxidačně redukčních procesů.

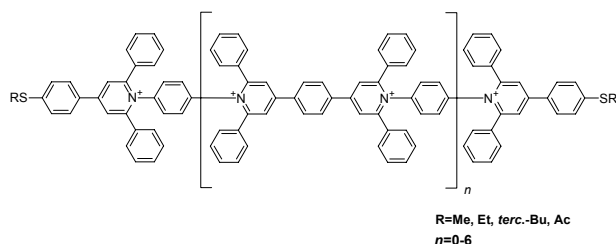
Bude prezentována nová syntetická cesta k přípravě oligomerů pyridiniového typu, ve kterých se pravidelně střídají 1,4-fenylenevé a 1,4-pyridiniové jednotky, která nevyžaduje separaci jednotlivých oligomerů. Tyto oligomery *p*-fenylen-bis-4,4'-(1-aryl-2,6-difenylypyridin) mají strukturu **1-4[n]** (Obr. 1). Monomery ($n = 1$) byly připraveny z *p*-fenylen-bis-4,4'-(2,6-difenylypyridin) a *p*-fenylen-diaminu, *p*-aminoacetanilidu nebo anilinu. Vyšší oligomery ($n > 1$, $R = \text{H}$) byly připraveny krokovým prodlužováním monomerů pomocí pyrylium-fenylen-pyridin³. Dále bude představena metoda na přípravu různě substituovaných oligomerů v polohách 2,6 na pyridiniových jednotkách. Monomer **5[1]** byl použit jako akceptorní část při konstrukci série donor-izolátor-akceptorů („molekulových diod“). Pro lepší rozpustnost byly též připraveny oligomery mající kovalentně vázané anionty v *para* polohách na fenylech ($R = \text{SO}_3^-$, COO^- , alkyl-A^-). Bude také pojednáno o vlivu aniontů na rozpustnost oligomerů, spektroskopických studiích a DFT optimalizací struktury³. Pro vodivostní měření byla připravena série oligomerů (Obr. 2) s vhodnými koncovými skupinami (alkylsulfanyly) vykazujícími specifickou afinitu k povrchu zlata. Bude prezentována jak syntéza těchto vhodných koncových skupin,

tak i vodivostní a elektrochemické studie této série oligomerů v závislosti na délce řetězce.

Obr. 1



Obr. 2



Tento projekt byl financován z grantů GA ČR 203/01/0644 a GA ČR 203/04/092.

LITERATURA

1. Dimroth K., Reichardt Ch.: Liebigs Ann. Chem. 93, 727 (1969).
2. Huang S.A.X., Chuang K. C.: Polymer 41, 5001 (2000).
3. Valášek M., Pecka J., Jindřich J., Michl J.: J. Org. Chem. 70, 405 (2005).

ANTIOXIDAČNÍ A CYTOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY EXTRAKTU *Vaccinium myrtillus*

KATEŘINA VALENTOVÁ

Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta
Univerzity Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
kata.valentova@email.cz.

Plody brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) jsou po staletí využívány jako potravina, ale také v lidovém léčitelství. Od 16. století je dokumentováno používání plodů borůvky při léčbě průjmů, močových kamenů, zánětů žlučníku, kurdějí, kašle a plicní tuberkulózy. V současnosti se extrakty používají při diarheách, gastritidách, dyspepsiích a při zánětech v dutině ústní a hltanu. Koncentrovaný extrakt je registrován jako oftalmologikum a vasoprotektivum. Plody obsahují zejména fenolové látky (anthocyaniny a stilbeny), vitaminy a sacharidy. Anthocyaniny, jejichž obsah v plodech se pohybuje mezi 0,1 a 0,5 %, jsou známé antioxidanty. Jejich cytoprotektivita vůči oxidativnímu poškození buněk nebyla dosud studována. Cílem práce bylo studium biologické aktivity extraktu *V. myrtillus* (EVM) na modelu potkaních hepatocytů poškozených modelovými toxiny. Primární kultury potkaních hepatocytů byly preinkubovány 30 min s EVM v koncentraci 100 a 500 µg ml⁻¹. Následně byla kultura intoxikována terc-butylyhydroperoxidem (0,5 mM, 1,5 h) nebo allylalkoholem (0,2 mM, 4 h). Hodnocena byla schopnost buněk redukovat tetrazoliovou sůl (MTT test životnosti

buněk), integrita buněčné membrány (aktivita uvolněné laktátdehydrogenasy, LDH) a koncentrace produktů lipidové peroxidace (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, TBARS). Extrakt na tomto modelu vykázal koncentračně závislý protektivní účinek, který se ve srovnání s kontrolou, obsahující pouze příslušný toxin, projevil vyšší životností buněčné kultury, nižší aktivitou LDH a nižší koncentrací TBARS. V koncentraci 500 µg ml⁻¹ EVM byly zjištěny hodnoty odpovídající 50 % hodnot kontrolní (neintoxikované) kultury. V podmínkách *in vitro* EVM zhasel enzymaticky generovaný superoxid s účinností 46,97±1,60 ekvivalentů superoxidodismutasy (U/mg). Za zjištěné protektivní účinky EVM vůči oxidativnímu poškození hepatocytů jsou odpovědní především anthocyaniny, jejichž obsah činil 24,99 % extraktu.

Děkuji firmě IVAX-Pharmaceuticals s.r.o. za poskytnutí standardizovaného extraktu. Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 6198959216.

KVASINKOVÉ SYSTÉMY PRO TRANSPORT KATIONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ

KLÁRA VELKOVÁ a HANA SYCHROVÁ

Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
velkova@biomed.cas.cz

Organismy se v okolním prostředí přirozeně setkávají především s ionty Na⁺, které jsou pro většinu z nich toxické. Naopak, uvnitř buněk je nutná vysoká koncentrace iontů K⁺. K udržování optimální vnitrobuněčné koncentrace kationtů alkalických kovů kvasinkovým buňkám slouží rozličné transportní systémy. Významné jsou nepochybně evolučně konzervované Na⁺/H⁺ antiportery, zprostředkující export kationtů alkalických kovů výměnou za proton. Doposud byly funkčně charakterizovány antiportery z pěti kvasinkových druhů. Podle substrátové specifity je možno rozdělit tyto proteiny do dvou skupin¹: i) transportující pouze Na⁺ a Li⁺ a ii) proteiny se širší substrátovou specifitou, rozpoznávající jako substrát také K⁺ a Rb⁺. Z rozdělení kvasinkových Na⁺/H⁺ antiporterů do těchto dvou skupin (v poměru 2:3) nelze usuzovat na jejich možnou primární funkci v životě kvasinkové buňky. Jedná se pouze o eliminaci toxických iontů Na⁺, nebo se také díky své schopnosti transportovat K⁺ podílejí na udržování buněčné homeostáze, např. regulaci pH v buňce? K získání odpovědi na tuto otázku by mohla přispět charakterizace většího počtu antiporterů z různých kvasinek. V naší laboratoři jsou v současné době studovány Na⁺/H⁺ antiportery ze dvou nekonvenčních kvasinek (osmotolerantní *Debaryomyces hansenii* a dimorfní kvasinky *Yarrowia lipolytica*) metodou heterologní exprese jejich genů v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* postrádajících vlastní systémy pro export kationtů alkalických kovů.

Tato práce vznikla s podporou těchto grantů GA ČR:
204/03/H066, 206/05/0035.

LITERATURA

1. Kinclová O., Potier S., Sychrová H.: Microbiology 148, 1225 (2002).

DETECTION OF PHOSPHATIDYLCHOLINE - SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C IN PLANT TISSUE**ŠTĚPÁNKA ZDAROVA^{a,b}, M. POTOCKÝ^b,
O. VALENTOVA^b, and J. MARTINEC^a**^a*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojova 135, 165 02 Praha 6, ^bInstitute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Praha 6*

Phospholipases (A2, C and D) are key molecules of broad range of signal transduction pathways in animals as well as in plants. They operate as parts of the phospholipid signaling system that transduces signals from the extracellular space to the cell. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) is an enzyme described up to now biochemically only in bacteria and animal cells. The enzyme catalyses hydrolysis of lipid phosphatidylcholine into phosphocholine (PCho) and diacylglycerol (DAG), both potential second messengers. On the gene level all available sequences of PC-specific phospholipase C comes from two groups of prokaryotic PC-PLCs. We have detected *in silico* PC-PLC homologs (putative PC-PLC genes) in *Arabidopsis thaliana* genome, comprising a novel gene family in plants.

In our investigation we have used microsomal fraction (MF) and plasma membrane enriched fractions (PM) from various plant materials as tobacco cell suspension culture, *A. thaliana* leaves or *Brassica napus* stems. The highly purified plasma membrane was prepared by phase partitioning in an aqueous PEG/dextran polymer two-phase system. PC-PLC activity was determined using radiolabelled PC as substrate. Products of enzymatic reaction were analyzed by HPLC.

The highest specific activity of this novel plant enzyme was found in tobacco cell culture BY2. Specific activity of PC-PLC was changing significantly during growth cycle of BY2 cell culture. We studied biochemical characteristics of the enzyme in PM. The enzyme was activated by millimolar Ca²⁺ concentrations and 0,15% (w/v) triton and its pH optimum was around 7. We also tested inhibitors of PLD and phosphatases to eliminate possible formation of PCho by another metabolic pathway. There were no significant variations. As a next step after successful detection of enzymatic activity in plant tissues we have focused on cloning of putative PC-PLC genes and their expression in heterologous (*E. coli*) system.

This work was supported by the Czech Ministry of Education, grant no. LN00A081.

REFERENCES

1. AGI: Nature 408, 796 (2000).
2. Wang X.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 211 (2001).

ACYLISOKYANÁTY V CHIRÁLNÍ ANALÝZE**PETR VODIČKA a LUDVÍK STREINZ***Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo nám. 2, Praha 6 – Dejvice, 166 00*

Acylisokyanáty nalezly široké využití jak v organické syntéze, tak jako pomocná činidla při analýze organických látek. Dosud však nebyly připraveny chirální acylisokyanáty, které by díky své reaktivitě a přítomnosti chirálního centra mohly mít zásadní význam v analýze opticky aktivních látek. Předmětem tohoto příspěvku tedy je příprava některých nových acylisokyanátů tohoto typu a studium jejich vlastností. V první fázi našeho výzkumu bylo připraveno několik typů chirálních acylisokyanátů. Po vyzkoušení různých způsobů přípravy se jako nejvhodnějším ukázala metoda, kdy byl acylisokyanát připraven reakcí příslušného amidu chirální kyseliny s oxalylchloridem. Ačkoliv uvedená metoda má obecnou platnost, ukázala se jako nevhodná pro amidy kyselin snadno podléhající racemizaci (viz. např. 2-fenyl-2-(1-naftyl)acetamid). V takovém případě byla vypracována individuální metoda přípravy.

Design látek byl navrhován tak, aby vznikající diastereomery měli vhodnou, dostatečně rigidní konformaci, ze které lze dobře vyvodit stereochemii analyzovaných látek.

V druhé části této práce jsme připravenými acylisokyanáty derivatizovali sérii chirálních sekundárních alkoholů. Analýzou $\Delta\delta$ NMR spekter vznikajících karbamátů jsme posuzovali účinnost těchto činidel ($\Delta\delta = \delta(R) - \delta(S)$) a dále jsme zjišťovali jejich nejvýhodnější konformaci. Přestože rozdíly $\Delta\delta$ nebyly příliš velké, prostorové uspořádání v centrální části molekuly bylo u všech derivátů totožné (potvrzeno počítačovými simulacemi a X-Ray analýzami). Na základě této stabilní konformace lze tedy i s malými rozdíly ve spektrech určovat nejen optickou čistotu, ale i absolutní konfiguraci analyzovaných látek.

Projekt byl podporován výzkumným záměrem Z4 055 0506 a grantem GAČR 203/05/2141.

LITERATURA

1. Vodička P., Streinz L., Koutek B., Buděšínský M., Ondráček J., Císařová I.: Chirality 15, 472 (2003).
2. Vodička P., Streinz L., Vávra J., Koutek B., Buděšínský M., Ondráček J., Císařová I.: Chirality, v tisku.

MECHANISMS OF MODULATION OF OXIDATIVE BURST BY QUATERNARY BENZOPHENANTHRIDINES**JÍŘÍ VRBA and MARTIN MODRIANSKÝ***Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc*

Oxidative burst, a part of cellular immunity, is a metabolic event that depends on protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation of cytosolic components of phagocyte NADPH oxidase. Sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE), quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids with anti-inflammatory activity, are known to inhibit microtubule assembly and PKC activity. We have previously shown that SA and CHE inhibits both chemotactic peptide *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced oxidative burst in DMSO-

differentiated HL-60 cells while this inhibition cannot be ascribed to direct inhibition of PKC activity. In this study we examined effect of SA and CHE on subcellular localization of phosphorylated PKC substrates, effect on phosphorylation of PKC, and whether SA and CHE inhibition of oxidative burst is related to the alkaloids interaction with microtubules. Western blot analyses of cytosolic and membrane fractions obtained from PMA-activated differentiated HL-60 cells showed that in the cytosolic fraction SA and CHE at concentrations from 2 to 10 μM decreased level of phosphorylated PKC substrate of ~ 50 kDa while increased level of ~ 60 kDa protein. In the membrane fraction SA and CHE caused concentration-dependent decrease of phosphorylated PKC substrates except the protein of ~ 50 kDa. Western blot detection also revealed that both alkaloids at the same concentrations accelerated dephosphorylation of PKC α/β II isoforms autophosphorylated at Thr638/Thr641. Furthermore, both SA and CHE induced phosphorylation of PKC by phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), but this action was observed only at higher alkaloid concentrations. Our experiments also showed that colchicine, vincristine, and taxol, microtubule interacting alkaloids, and benzimidazole derivative nocodazole inhibited neither fMLP nor PMA-induced oxidative burst, thus, it is microtubule-independent. We conclude that SA and CHE affect PKC activity in different cellular compartments and cause acceleration of specific PKC dephosphorylation, rather than PDK1-mediated PKC phosphorylation, thus contributing to the oxidative burst inhibition.

This research was supported by grant MSM CR 6198959216.

DUAL BEHAVIOUR OF BERBERINE ON AhR-DEPENDENT TRANSCRIPTION

RADIM VRZAL^a, ADÉLA ZDAŘILOVÁ^a, LUDEK BLÁHA^b, and ZDENĚK DVORÁK^a

^a*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc,*
^b*Masaryk University Brno, Res. Ctr. for Environmental Chem. and Ecotoxicology (RECETOX), Kamenice 3, 625 00 Brno.*

The plants containing berberine, a quarternary isoquinoline alkaloid, have been used in the traditional medicine for the centuries. Berberine itself exhibits antibacterial, anti-inflammatory and antitumor effects. As the consequence of growing concern about the use of natural products in the pharmacotherapy, the investigation of possible interactions between P450 system and these products is of the general interest. Cytochrome P450 1A1, an enzyme which is under transcription control of aryl hydrocarbon receptor (AhR), is involved in the promotion of cancer due to its ability to transform pro-carcinogenes (e.g. benzo[a]pyrene) into the ultimate carcinogens. Thus, potential influence of P450 1A1 might have an impact in terms of cancer prevention.

In this work, we examined the influence of berberine on AhR-dependent transcription. An increased CYP1A1 mRNA level (HepG2 cells) and AhR-dependent luciferase activity (H4IIE.luc cells) were observed with high concentration of

berberine (10-50 μM) and in short incubation periods (6 and 24 h). Long incubation period (48 h) and low doses of berberine (< 1 μM) had no effect. HPLC analyses refuted the hypothesis of berberine metabolic transformation by human and rat hepatoma cells. Furthermore, we have found berberine to be an inhibitor of CYP1A1 enzyme activity both in cell culture (HepG2) and on pure enzyme ($\text{IC}_{50} = 2,5$ μM). Whether berberine acts as a ligand of AhR or it triggers some signaling pathway, remains to be disclosed.

This work was supported by the grant MSM CR 6198959216 and the grant GA CR 303/04/P074.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ STACIONÁRNÍCH FÁZÍ NA BÁZI ZrO₂ V KONTROLE LÉČIV

VÁCLAV ŽIŽKOVSKÝ, RADIM KUČERA, JAROSLAV SOCHOR a JIŘÍ KLIMEŠ

*Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
zizkovskyyv@faf.cuni.cz*

V moderních léčivých přípravcích bývá stále častěji zastoupeno více chemických substancí, jejichž struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti (M_r , pKa, log P) jsou značně odlišné. Navíc chemicko-fyzikální vlastnosti příbuzných látek, popřípadě degradačních produktů, které se vyskytují jako nečistoty v léčivu, bývají velmi podobné léčivu vlastním. Proto je nezbytné vyvíjet nové separační metody kontrolně analytického hodnocení, které mají dostatečnou selektivitu i pro separaci takto komplikovaných směsí. Vedoucí úlohu v kontrole léčiv má bezesporu HPLC. Naprostá většina aplikací využívá pro separaci kolony s modifikovaným silikagelem i přes jeho známá omezení (pH a tepelná stabilita, interakce zejména bazických léčiv s volnými silanoly). Jako zajímavou alternativou ke standardním silikagelovým kolonám se jeví stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého. Tyto stacionární fáze jsou v posledních letech velmi intenzivně studovány pro mnoho jejich pozitivních vlastností využitelných právě v chromatografii. Zejména jde o vysokou chemickou (pH $\approx 1-14$) a tepelnou (cca do 200 °C) stabilitu. Zirkoniová kolona se chová díky přítomnosti volných *d*-orbitalů u Zr (IV) atomů v kyselém a neutrálním prostředí jako aniontový měnič, zatímco v bazické oblasti má schopnost fungovat jako měnič kationtů. Z toho vyplývá, že na výsledné retenci se podílí nejen reverzní mechanismus jako u modifikovaného silikagelu, ale selektivita kolon je výrazně ovlivněna i iontovými interakcemi analytu se stacionární fází. Možnost pracovat za zvýšené teploty se pozitivně odráží na zvýšení sorpční kinetiky a snížení viskozity mobilní fáze, což vede ke zkrácení doby analýzy a snížení zatížení pumpy přístroje. Z těchto důvodů se naskýtá možnost výhodného využití kolon na bázi ZrO₂ pro separaci a analytické hodnocení řady léčiv.

V naší pilotní studii jsme se zaměřili na využití kolon se stacionární fází na bázi ZrO₂ ve zkoušce na příbuzné látky a rozkladné produkty u široce využívaného nesteroidního antiflogistika ibuprofenu – jako modelové látky (analyt

obsahuje různě kyselé a neutrální látky s odlišnými pKa a log P hodnotami). K hodnocení jak substance tak i léčivého přípravku (krém) jsme úspěšně využili analytické kolony Discovery®Zr-PS a Discovery®ZrCarbonC18. Při vývoji metody jsme se zaměřili na faktory ovlivňující retenci a selektivitu. Jako rozhodující faktor ovlivňující interakci analytu se stacionární fází se ukázalo nastavení pH eluentu. Zvláště pak u analýzy léčivého přípravku, kde spolu s rozkladnými produkty ibuprofenu byly hodnoceny konzervační látky (parabeny) a 4-hydroxybenzoová kyselina jako jejich degradační produkt. Všechny látky byly úspěšně separovány s dostatečným rozlišením a v kratších retenčních časech než na běžných reverzních fázích. Dosažené výsledky naznačují širokou možnost ve využití zirkoniových stacionárních fází v kontrole kvality a kvantity léčiv, zvláště pak v případech, kde je třeba výrazně jiné selektivity, než je možno dosáhnout na běžně užívaných modifikovaných silikagelech.



SIGMA-ALDRICH

SEZNAM AUTORŮ

Adam, Vojtěch	353, 377, 378, 379	Frei, Eva	353
Aimová, Dagmar	353	Fryček, Rudolf	359
Alexandrová, Zuzana	354, 382	Fuchs, Renate	356
Anděra, Ladislav	359	Gagnon, Jean	367
Anelli, Pier Lucio	370	Gilboa-Garber, Nechama	367
Babula, Petr	377	Guryča, Vilém	359
Bartůšek, Karel	377	Halada, P.	378
Bělohradský, Martin	380	Haškovec, Cedrik	374
Bendová, Z.	369	Havel, Ladislav	377
Beranová, Katarina	354	Havlíček, Libor	376
Bílková, Zuzana	375	Helánová, Šárka	360
Bláha, Luděk	392	Herrmann, Pavel	360
Blanářová, Olga	361	Hocek, Michal	382
Blašík, Ondřej	378	Hofmanová, Jiřina	361
Bleha, Miroslav	368	Holý, Petr	380
Böhmová, Gabriela	355	Honys, David	365
Borská, Romana	369	Horváth, Viktor	361
Bosáková, Z.	383	Hradilová, Jana	361
Brabec, Marianne	356	Hrachovinová, Ingrid	380
Brdička, Radim	372	Hrdina, Radim	362
Bruchová, Hana	372	Hrkal, Z.	378
Brynda, Jiří	387	Husáková, Petra	372
Brzobohatý, B.	361	Chaloupková, Radka	362
Brzobohatý, Břetislav	355	Chramostová, Kateřina	388
Bulánková, Petra	355	Chrastilová, Zuzana	387
Ciencialová, Alice	357	Chvátalová, Kateřina	363
Císařová, Ivana	380, 385	Illnerová, H.	369
Čáp, Michal	356	Imberty, Anne	367
Čečková, Martina	356	Imramovský, Aleš	363
Čejková, A.	384	Janalíková, Magda	364
Čermák, Jan	379, 385	Jeníková, Gabriela	387
Červený, Lukáš	357	Jinoch, Pavel	380
Češková, Pavla	360	Jiráček, Jiří	357
Číž, Milan	388	Karpenko, Vladimír	371
Damborský, Jiří	362	Káš, Martin	365
Divišová, Hana	372	Kizek, René	353, 377, 378, 379
Doubravová, Kateřina	358	Klamová, Hana	374
Dračínský, Martin	358	Klejduš, Bořivoj	365
Dubská, Lenka	359	Klimeš, Jiří	392
Dvořák, Zdeněk	392	Knoppová, Monika	365
Dvořáková, Hana	383	Koblovská, Radka	365
Fabry, Milan	387	Koc, Michal	366
Fernetti, Cristina	370	Kočalka, Petr	366
		Konečná, Hana	355
		Kopečný, Jiří	367

Kostlánová, Nikola	367	Michálek, J.	383
Kotašková, Jana	369	Michálek, Jiří	358
Kotlík, Petr	384	Michl, Josef	389
Kotora, Martin	360, 362, 373, 374	Mikšanová, Markéta	381
Koukalová, Šárka	355	Mistr, Adolf	361
Koutek, Bohumír	357	Mitchell, Edward	367
Kováčiková, Z.	369	Modrianský, Martin	391
Kovář, Jan	366	Moravcová, Jana	374
Kozmík, Václav	370	Müller, Petr	373
Kozubík, Alois	361, 388	Nadřová, Zuzana	366
Kráčalíková, Kateřina	368	Neča, Jiří	388
Královský, Josef	375	Nečas, David	373
Kroutil, Aleš	361	Nešvera, Jan	365
Kryštof, Vladimír	373, 376	Novák, Petr	374
Křenková, Jana	375	Novotná, Zuzana	377
Kubáč, David	368	Novotný, Miloš V.	359
Kučera, Radim	392	Opatřilová, Radka	374
Kurfürst, Milan	370	Otáhalová, Eva	374
Kusenda, Branislav	369	Ouzká, Šárka	375
Kutý, M.	376	Pacáková, Věra	359
Lapčík, Oldřich	365	Palenčár, Petr	376
Laurinová, K.	369	Palková, Zdena	356, 386
Lhoták, Pavel	365, 383	Paprskářová, Martina	376
Libra, Antonín	356, 370	Pascolo, Lorella	370
Libus, Jiří	370	Pátek, Miroslav	365
Lojek, Antonín	388	Pávek, Petr	356, 357
Lorusso, Vito	370	Pecka, Jaroslav	389
Lubal, Přemysl	353	Pejchar, Přemysl	377
Macek, Tomáš	387	Pěničková, Kateřina	388
Macková, Martina	354, 357, 387	Petrlová, Jitka	353, 378, 379
Macková, Zuzana	365	Petřek, Jiří	377
Machala, Miroslav	388	Pluskalová, Michaela	378
Machara, Aleš	370	Pohl, Radek	366
Maláková, Jana	357	Pojarová, Michaela	383
Malý, Petr	387	Polanc, Slovenko	363
Marinov, I.	378	Pospěchová, Kateřina	356
Marková, Vladimíra	387	Pospíšilová, Šárka	369
Maršálková, Linda	371	Pošta, Martin	379
Martinec, Jan	377	Potěšil, David	353, 377, 378, 379
Martinec, J.	391	Potočky, M.	391
Martínková, Ludmila	368	Prokop, Zbyněk	362
Masařík, Michal	379	Rejman, Dominik	366
Matyk, Josef	372	Rittich, Šimon	380
Merkerová, Michaela	372	Rosenberg, Ivan	366
Mihovilovic, M.D.	384	Rybáčková, Markéta	380

Rýdlová, Helena	381	Štruncová, Soňa	369
Ryšlavá, Edita	354	Švihálková Šindlerová, Lenka	361, 388
Salaj, Peter	380	Tichý, Boris	369
Sehnal, Petr	354, 382	Tiribelli, Claudio	370
Sejbal, Jan	358	Truksa, Jaroslav	366
Sheard, Michael	359	Turánek, Jaroslav	361
Sládek, M.	369	Turek, Pavel	374
Slanina, Jiří	363	Turský, Matyáš	373
Sochor, Jaroslav	392	Uldrijan, Stjepan	373
Souček, Karel	361	Umannová, Lenka	388
Sova, Petr	361	Upham, Brad L.	388
Spíchal, Lukáš	385	Vácha, F.	376
Stará, Irena G.	354, 382	Váchová, Libuše	386
Starý, Ivo	354, 382	Valášek, Michal	389
Stibor, Ivan	365, 383	Valentová, Kateřina	390
Stiborová, Marie	353, 381	Valentova, Olga	377
Strachotová, Dita	386	Valentova, O.	391
Streinz, Ludvík	391	Velková, Klára	390
Strnad, Miroslav	373, 376, 385	Veselý, Martin	365
Strouhal, Michal	386	Visigalli, Massimo	370
Suchá, Veronika	387	Víteček, Jan	377
Sumová, A.	369	Vlašínová, Helena	377
Surá, Martina	387	Vodička, Petr	391
Sures, Bernd	353	Vojtěšek, Bořivoj	360, 373, 379
Suttnar, Jiří	380	Vojtišek, Pavel	379
Svoboda, Jiří	370	Vondráček, Jan	388
Svobodová, Eva	389	Vrba, Jiří	391
Sychrová, Hana	390	Vrzal, Radim	392
Sýkora, Jan	379, 385	Vyskot, Boris	355
Sylvestre, Michal	387	Vyzula, Rostislav	360
Szekeres, Miklos	387	Wimmerová, Michaela	367
Šaman, David	354, 382	Závada, Jiří	380
Šedo, Ondrej	381	Zdarova, Štěpánka	391
Šilhár, Peter	382	Zdařilová, Adéla	392
Šimánová, Markéta	383	Zdráhal, Zbyněk	355
Širc, Jakub	383	Zehnálek, Josef	353
Široký, Jiří	355	Žák, František	361
Škrdlantová, Markéta	384	Žižkovský, Václav	392
Šmajš, David	364, 386		
Šnajdrová, Radka	384		
Špalt, Zbyněk	385		
Šťastná, Lucie	385		
Štaud, František	356, 357, 370		
Štěpánová, Lucie	375		
Štorchová, Helena	370		

