

Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, člen FEBS a IUBMB
Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV
Občianske združenie Veda a život

DROBNICOV MEMORIÁL

VII. ročník



Bojná, 16-18. september 2013





Prof. Ing. Ľudovít DROBNICA, DrSc.

DROBNICOV MEMORIÁL

VII. ročník

16. – 18. September 2013

Bojná



ISBN 978 – 80 – 970164 – 5 – 6

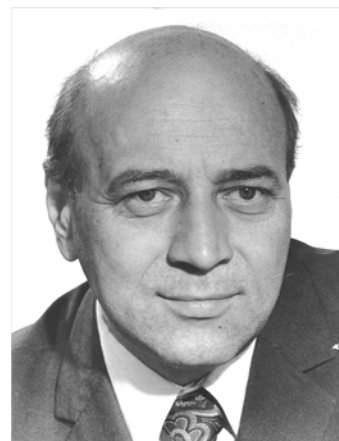
Vychádza v redakčnej úprave: Boris Lakatoš ,Michaela Pavlovičová, Andrej Rusnák

Vydal: Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2013

Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 2013

Spomienka na prof. Ing. Ľudovíta Drobnicu, DrSc.

Narodil sa 30. septembra 1930 v Trnave. Po skončení vysokoškolského štúdia v Brne v roku 1953 nastúpil na Katedru technickej mikrobiológie a biochémie Chemickej fakulty Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave. Tu prešiel všetkými učiteľskými stupňami. Na fakulte patril medzi prvých vedeckých ašpirantov. Hodnosť kandidáta vied získal už v roku 1958. Docentom bol v odbore Biochémia a fyziológia mikroorganizmov od roku 1964. Vedeckú hodnosť doktora vied získal na Ústave organickej chémie a biochémie v Prahe pre odbor Biochémia v roku 1973. Bohužiaľ, profesorom sa z politických dôvodov nestal ani do svojej predčasnej smrti v roku 1980 (napriek tomu, že vychoval viac než 100 diplomantov a viac než 20 ašpirantov). Bol ním menovaný po zmenách v roku 1989 in memoriam.



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

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

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

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

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

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

doc. Ing. Albert BREIER, DrSc.

PhDr. Zuzana KLIMEŠOVÁ

RNDr. Michaela PAVLOVIČOVÁ, PhD.

Ing. Andrej RUSNÁK, PhD.

Ing. Zdena SULOVÁ, CSc.

doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, CSc.

doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.

PRESEDA KOMISIE:

prof. RNDr. MARTA KOLLÁROVÁ, DrSc.

ČLENOVIA KOMISIE:

RNDr. Imrich BARÁK, DrSc.

doc. Ing. Albert BREIER, DrSc.

prof. RNDr. Peter FEDOROČKO, CSc.

doc. MVDr. Juraj KOPPEL, DrSc.

doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.

doc. RNDr. Peter PRISTAŠ, CSc.

doc. RNDr. Peter RAČAY, CSc.

Ing. Zdena SULOVÁ, DrSc.

doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, CSc.

Obsah

PROGRAM:	13
ZBORNÍK PRÍSPEVKOV	17
Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok.....	21
Sekcia II Biochémia a biofyzika biologických membrán.....	37
Sekcia III Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia	51
Sekcia IV Enzymológia a proteomika.....	89
POSTEROVÁ SEKCIA.....	103

PROGRAM:

❖ 1. Deň: 16. 9. 2013 (pondelok)

- 12:00 -13:00 Registrácia účastníkov
- 13:00 -14:00 Obed
- 14:00 -14:15 Otvorenie
- 14:15- 14:45 Úvodná prednáška: **Hudec Roman.** Molekulárne prejavy Huntingtonovej choroby: od mitochondria k endoplazmovému retikulu
- 14:45 -15:00 **PRESTÁVKA**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

predseda: Ernest Šturdík, Zdena Sulová,

- 15:00-15:15 **Dolinská Michaela.** Výskyt avermektínovej rezistencie v chovoch oviec na Slovensku
- 15:15-15:30 **Danihelová Martina.** Bioaktivity nových derivátov a komplexov flavonoidov s potenciálnym profylaktickým a terapeutickým využitím
- 15:30-15:45 **Heizer Tomáš.** Protektívne účinky nosyntetizovaných derivátov kvercetínu voči UVA žiareniu
- 15:45-16:00 **Halaburková Andrea, Dott.** Inhibítory histón deacetyláz v kombinácii s fotodynamickou terapiou
- 16:00-16:15 **Jendželovská Zuzana.** Hypericín ako látka s možným negatívnym vplyvom na účinok chemoterapeutík
- 16:15-16:30 **Turáková Katarína.** Potenciálne inhibítory glukozylceramid syntázy a viabilita buniek
- 16:30-16:45 **Kliková Katarína.** Vplyv tanespimycínu, pifitrínu- μ a metylénovej modrej na prežívanie a chemosenzitivitu u HL-60 a K-562
- 16:45-17:00 **Štefaniková Andrea.** Smrť buniek HL60 indukovaná butyrátom sodným je urýchlená ABT-737
- 17:00-17:20 **PRESTÁVKA**

Sekcia II Biochémia a biofyzika biologických membrán

predseda: Albert Breier, Boris Lakatoš,

- 17:20-17:35 **Balážová Mária.** Vplyv aniónových fosfolipidov na funkciu mitochondrií v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*
- 17:35-17:50 **Seč Peter.** Vplyv neutrálnych lipidov na sekréciu mastných kyselín u *Saccharomyces cerevisiae*

- 17:50-18:05 **Hano Milan.** Štúdium vplyvu nadexpresie P-glykoproteínu na zmeny zloženia povrchových sacharidov v leukemických bunkách L1210
- 18:05-18:20 **Lichvárová Lucia.** Tetraspanin-13 moduluje aktivitu Cav2.2 kanála
- 18:20-18:35 **Grman Marián.** Interakcia H₂S s S-nitrózoglutatiómom - vplyv pH, O₂ a nízkomolekulových tiolov.
- 18:35-18:50 **Mišák Anton.** pH modulácia šírky póru mitochondriálnych chloridových kanálov
- 19:20 **VEČERA, neformálna diskusia**

❖ **2. Deň: 17. 9. 2013** (utorok)

8:45-9:20 **RAŇAJKY**

Sekcia III Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

predseda: Peter Račay, Peter Fedoročko

- 09:25-09:40 **Messingerová Lucia.** Multidrug rezistencia pri liečbe myelodysplastického syndrómu
- 09:40-09:55 **Vargovič Peter.** Opakovaný stres zvyšuje produkciu endogénnych catecholamínov v adipocytoch mezenterického tukového tkaniva potkana
- 09:55-10:10 **Pilchová Ivana.** Vplyv proteazomálneho stresu na prežívanie neuroblastómových a glioblastómových buniek
- 10:10-10:25 **Richterová Romana.** Sledovanie výskytu polymorfizmov vybraných génov u pacientov s mozgovými nádormi
- 10:25-10:40 **Kaňková Zuzana.** Vplyv gonadálnych steroidov na génovú expresiu vybraných cytokínov v makrofágoch kury domácej

10:40-11:15 **PRESTÁVKA**

Sekcia III. Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

predseda: Albert Breier, Juraj Koppel

- 11:15-11:30 **Hatok Jozef.** Úloha neurotrofických faktorov pri hypersenzitívite nervov sprostredkujúcich bolesť z vnútorných orgánov
- 11:30-11:45 **Jašková Katarína.** TGF-β1 ako kľúčový regulátor molekulárnych vlastností cerebelárnych granulárnych neurónov v in vitro podmienkach
- 11:45-12:00 **Novák Petr.** Lifestyle and Alzheimer's: how stress can set your brain on fire
- 12:00-12:15 **Klačanová Katarína.** Vplyv globálnej mozgovej ischémie na proteíny Bcl-2 rodiny obsahujúce len BH3 doménu
- 12:15-12:30 **Santosh Jadhav.** Tau protein as a perpetrator of synaptic dysfunction
- 12:45-13:45 **OBED**

Sekcia III Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

predseda: Imrich Barák, Marta Kollárová

- 14:00-14:15 **Práznovská Margaréta.** DNA vakcína voči vírusu chrípky typu A.
14:15-14:30 **Bombarová Marta.** Molekulárna cytogenetika archaických a odvodených skupín motolíc (*Trematoda*).
14:30-14:45 **Víchová Bronislava.** Cirkulácia a genetická variabilita *Anaplasma phagocytophilum* na Slovensku
14:45-15:00 **Kotlárová Lucia.** Konštrukcia mutantných vírusov chrípky so zmenenou fuzovacíou aktivitou metódou reverznej genetiky
15:00-15:15 **Košík Ivan.** Význam substitúcií K73,78,85R PB1F2 proteínu vírusu chrípky typu A pre jeho biologické vlastnosti
- 15:15-15:40 **PRESTÁVKA**

Sekcia III. Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

predseda: Boris Lakatoš, Peter Pristaš

- 15:40-15:55 **Tišáková Lenka.** Charakterizácia špecificity C-terminálnych väzobných domén bakteriofágových endolyzínov
15:55-16:10 **Nováková Jana.** Hľadanie biologicky aktívnych látok v pôdnom metagenóme
16:10-16:25 **Vandžurová Anna.** Guáno netopierov ako možný rezervoár patogénnych mikroorganizmov
16:25-16:40 **Stramová Zuzana.** Skládky nebezpečného odpadu - environmentálne riziko alebo zdroj biotechnologicky využiteľných baktérií?
16:40-16:55 **Dolejš Igor.** Imobilizácia anaerobných mikroorganizmov
- 16:55-17:20 **PRESTÁVKA**

Sekcia IV Enzymológia a proteomika

predseda: Marta Kollárová, Ernest Šturdík

- 17:20-17:35 **Kaločayová Barbora.** Zmeny kinetických vlastností Na,K-ATPázy v mozgovej kôre potkanov oboch pohlaví v akútnej fáze ochorenia diabetes mellitus typu 1
17:35-17:50 **Bertók Tomáš.** Príprava nanoštruktúrovaných povrchov a ich využitie v medicínskej diagnostike proteínových markerov chorôb
17:50-18:05 **Šedivá Alena.** Vývoj a využití microarray jako lektinového biočipu pro charakterizaci glykanových struktur u kolorektálního karcinomu
18:05-18:20 **Schenkmayerová Andrea.** Mikrobiálny biosenzor na monitorovanie Baeyerovej-Villigerovej biooxidácie
18:20-18:35 **Zajkoska Petra.** Celobunková biokatalýza s rekombinantnou monoaminoxidázou
18:35-18:50 **Borko Lubomír.** Ľudský srdcový ryanodínový receptor: štruktúrne štúdie N-terminálnej oblasti
- 19:20 **VEČERA, neformálna diskusia, voľná zábava**

❖ **3. Deň: 18. 9. 2013 (Streda)**

8:45-9:30 **RAŇAJKY**

POSTEROVÁ SEKCIA (9:45-10:15)

predseda: Imrich Barák, Juraj Koppel

1. **Birošová Lucia.** Problematika výskytu baktérií rezistentných voči antibiotikám v kaloch a odpadových vodách na Slovensku (Sekcia III)
2. **Hil'ovská Lucia.** Zvýšená cytotoxicita mitoxantrónu navodená vplyvom proadifenu v bunkách ľudskej promyelocytovej leukémie (Sekcia III)
3. **Illésová Anikó.** Biotechnologická produkcia prírodných aróm s využitím enkapsulovaných biokatalyzátorov (Sekcia IV)
4. **Talafová Klaudia.** Syntéza CTP *in vitro* kaskádou enzýmových reakcií (Sekcia IV)

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

11:45-12:45 **Vyhlásenie výsledkov súťaže mladých vedeckých pracovníkov a ukončenie 7.ročníka Drobnicovho memoriálu**

12:45–13:45 **OBED**

14:00 **Pre záujemcov návšteva hradiska Bojná – Valy**

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

MOLEKULÁRNE PREJAVY HUNTINGTONOVEJ CHOROBY: OD MITOCHONDRÍÍ K ENDOPLAZMOVÉMU RETIKULU

Roman Hudec^{1,3,#}, Peter O Bauer², Veronica Costa^{3,4}, Nobuyuki Nukina², Katsuhiko Mikoshiba¹, Ernesto Carafoli³, Luca Scorrano^{3,4}

¹Laboratórium vývojovej neurobiológie a ²Laboratórium štrukturálnej neuropatológie, BSI, RIKEN, Wako, Japonsko; ³VIMM, Padova, Taliansko; ⁴Oddelenie bunkovej fyziológie a medicíny, Univerzita v Ženeve, Ženeva, Švajčiarsko; #Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU Bratislava, Bratislava, Slovensko

Úvod: Huntingtonova choroba (z angl. Huntington's disease - HD) je spôsobená mutáciou, ktorá zvyšuje počet CAG opakovaní v géne kódujúcom proteín huntingtín (Htt). Výsledkom tejto mutácie je patologická expanzia aminokyseliny glutamínu (Q) za vzniku tzv. polyQ-stretch na N-terminálnom konci Htt. Napriek tomu, že Htt je exprimovaný vo všetkých tkanivách, jeho mutácia vedie u pacientov postihnutých HD primárne k motorickej a kognitívnej disregulácii. Molekulárna etiológia tohto ochorenia však zostáva napriek neutíchajúcemu vedeckému úsiliu stále záhadou. Na jej vyriešenie sa používa množstvo bunkových i zvieracích modelov, ktorých použitie prispelo k objasneniu množstva biochemických zmien, ktoré dobre popisujú stratu funkčnosti HD neuronálnych buniek a to hlavne v striatálnej a čiastočne v kortikálnej oblasti mozgu. Napriek tomu, účinná liečba ešte nebola nájdená.

Materiál a metódy:

Bunkové modely: *STHdhQ7* resp. Q111, Neuro 2a, HeLa

Myší model: FVB resp FVBTg – YAC128

Biochemické a analytické metódy: imunoprecipitácia, imunobloting

imunocytochémia, cytometria

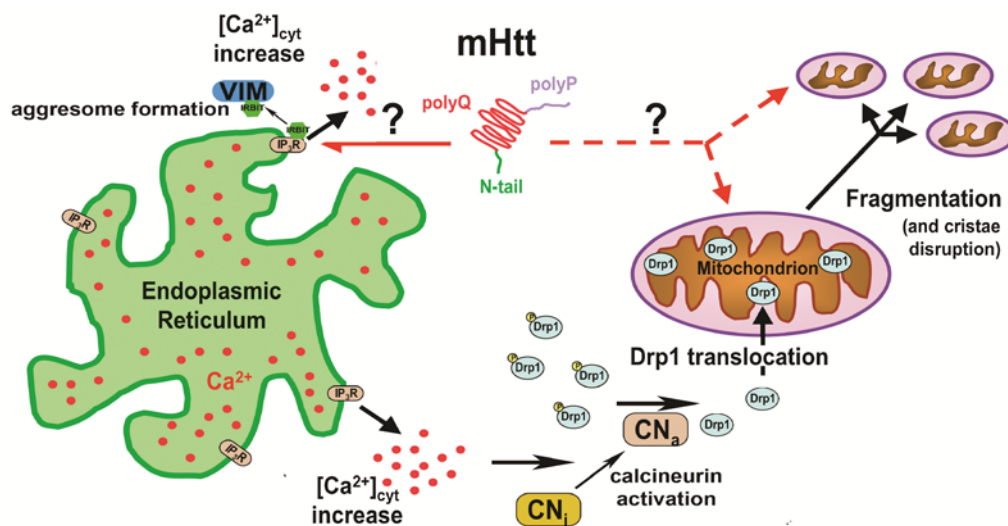
Mikroskopia: konfokálna, rotačná konfokálna, fluorescenčné skenovanie

Meranie cytosolového a organelového Ca^{2+} : fluorescenčná mikroskopia

aequirinometria

Výsledky a diskusia: V tejto práci vám chem sprostredkovať sumarizáciu viacerých prístupov, ktorými sme sa zaoberali pri výskume HD (**Obr.1**). Už v preklinickom štádiu je pozorovateľná zreteľná fragmentácia retikula mitochondrií a strata integrity mitochondriových kríst, ktoré sú dôsledkom zvýšenej mitochondriovej akumulácie kalcineurínom (CN) defosforylovaného proteínu *DRP1*. Tieto zmeny sú sprevádzané zmenenou kapacitou mitochondrií udržiavať Ca^{2+} ióny a zvyšujú ich susceptibilitu voči

niektorým induktorom programovanej bunkovej smrti, apoptózy. Vápniková deregulácia pretrváva i v akútnom štádiu ochorenia, ku ktorej prispieva i zmena afinity *IP3 receptora* voči regulačným proteínom *IRBIT*-u. Tento je sekvestrovaný do tzv. agregómu, pomocou fibrilárneho proteínu vimentínu (*VIM*) a zároveň dochádza k akumulácii mutantného Htt (*mHtt*) v tejto štruktúre, čím sa zamedzuje jeho účinnej degradácii. Naše pozorovania spolu so zisteniami ďalších vedeckých tímov konvergujú k alteráciám homeostázy Ca^{2+} iónov a/alebo k stresovým odpovediam sprostredkovaným mitochondriami a zmenám molekulárnej štruktúry a bunkovej distribúcie mutantného Htt, ktoré zohrávajú esenciálnu úlohu v patológii HD a vytvárajú chýbajúce prepojenie medzi vznikom mutácie v Htt a manifestáciou a progresom HD.



Obr.1 Molekulový mechanizmus patologických zmien počas HD

Sekcia I

Xenobiotiká a **vzt'ahy medzi štruktúrou a účinkom**
látok

VÝSKYT AVERMEKTÍNOVEJ REZISTENCIE V CHOVOCH OVIEC NA SLOVENSKU

Michaela Dolinská, Alžbeta Königová, Marián Várady

Parazitologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice

Úvod: Zdravotný stav oviec ovplyvňuje viacero faktorov, medzi ktoré radíme aj parazitárne infekcie gastrointestinálneho traktu. Na prevenciu a terapiu parazitóz sa v dnešnej dobe používajú 3 skupiny antihelmintík so širokým spektrom účinku – benzimidazoly, imidazotiazoly/tetrahydropyrimidíny a avermektíny /makrocyclické laktóny (ML). Intenzívne a nesytemové používanie antihelmintík nielen voči gastrointestinálnym parazitom viedlo k nežiaducemu stavu - vzniku rezistencie. Problematika vzniku rezistencie voči chemoterapeutikám prešla postupným vývojom od ojedinelých nálezov začiatkom šesťdesiatych rokov až po súčasný stav, keď rezistencia k antihelmintikám predstavuje vážny ekonomický problém, hlavne v krajinách s rozvinutým chovom hospodárskych zvierat. Rezistenciu je možné detegovať pomocou *in vivo* a *in vitro* metód. Cieľom tejto práce bolo vybrať medzi spomínanými metódami najcitlivejšiu a najspoľahlivejšiu metódu na detekciu rezistencie voči ML a pomocou tejto metódy preskúmať situáciu výskytu rezistencie na Slovensku.

Materiál a metódy: Na detekciu rezistencie sme použili *in vitro* test vývinu lariev, ktorý je vhodnou citlivou a spoľahlivou metódou na určenie rezistencie voči ML. Vyšetrených bolo 49 fariem zo 17 okresov Slovenska. 3 farmy nebolo možné vyšetriť z dôvodu nízkeho výskytu vajíčok vo vyšetrovanom materiáli. Pri prieskume výskytu rezistencie voči antihelmintikám zo skupiny ML sme vzorky odoberali od oviec (väčšinou sa jednalo o 2-3 ročné bahnice) plemena cigája, slovenské merino a zošľachtená valaška.

Výsledky a diskusia: Naše výsledky poukazujú na výskyt vysokej rezistencie (viac ako 30%-né zastúpenie rezistentných parazitov v skúmanej vzorke) na 2 farmách (4,35%), na výskyt nízkej rezistencie (< 30% rezistentných parazitov vo vzorke) na 12 farmách (26,07%) zo 46 vyšetrených fariem a 32 fariem (69,56%) bolo bez výskytu rezistentných parazitov. Prieskum výskytu rezistencie voči antihelmintikám zo skupiny ML na Slovensku doposiaľ nebol uskutočnený s výnimkou práce Čerňanskej a kol. (2006), ktorí popri detekcii rezistencie na skupinu benzimidazolových antihelmintík, zistili aj výskyt rezistencie na liečivo ivermektín na 6 farmách (23,1%) z 26 vyšetrených fariem. Čerňanská a kol. (2006) uvádzajú, že hlavným dôvodom pre neočakávané vysoký percentuálny výskyt rezistencie na farmách na Slovensku, by mohlo byť používanie generických prípravkov ivermektínu, ktorými

boli zvieratá v prieskume liečené. Na problém zníženej účinnosti generických liečiv u parazitov hospodárskych zvierat už v minulosti poukázal van Wyk a kol. (1997). Na základe týchto poznatkov by mohol byť výskyt IVM rezistencie na ML nižší ako v skutočnosti autori uvádzajú (Čerňanská a kol. 2006).

Záver: Oba vykonané prieskumy dokazujú, že rezistencia na túto skupinu antihelmintík je v chovoch oviec na Slovensku už prítomná. Chovatelia preto musia dodržiavať opatrenia, pomocou ktorých možno zabrániť rýchlejšiemu nástupu ML rezistencie, inak hrozí, že výskyt rezistentných parazitov a s ním spojená neefektívna liečba môže v blízkej budúcnosti negatívne ovplyvniť ekonomiku našich chovov.

BIOAKTIVITY NOVÝCH DERIVÁTOV A KOMPLEXOV FLAVONOIDOV S POTENCIÁLNYM PROFYLAKTICKÝM A TERAPEUTICKÝM VYUŽITÍM

Martina Danihelová¹, Miroslav Veverka², Emil Švajdlenka², Soňa Jantová¹, Ernest Šturdík¹

¹Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia FCHPT STU Bratislava, ²Eurofins Bel/Novamann s.r.o. Bratislava

Úvod: Flavonoidy sú už desaťročia známe svojimi benefítmami pre ľudské zdravie. Ich účinky sú však závislé na rozpustnosti a stabilite v príslušných prostrediach. Chemickou i enzymatickou derivatizáciou flavonoidov možno pripraviť zlúčeniny so zmenenými fyzikálno-chemickými vlastnosťami, mnohokrát so zlepšenými biologickými účinkami. Významné môže byť sledovanie prírodných derivátov flavonoidov, ktoré vo svojich reálnych matriciach môžu synergicky spolupôsobiť s ostatnými prítomnými bioaktívnymi zložkami. Vývoj a testovanie rôznych derivátov a komplexov flavonoidov ako aj príprava koncentrátov flavonoidov z prírodných zdrojov sa stali zámerom tejto práce.

Materiál a metódy: V práci sa testovalo 23 derivátov rutínu, naringínu, eskulínu a floridzínu s mastnými kyselinami, 15 derivátov kvercetínu pripravených chemickou syntézou, 6 komplexov kvercetínu s inými bioaktívnymi látkami a 10 odrôd pohánky, ktorá je bohatým zdrojom rutínu.

U týchto vzoriek sa sledovala antioxidačná aktivita spektrofotometricky využitím 4 rôznych metód. Inhibícia vybraných proteáz bola meraná taktiež spektrofotometricky pomocou chromogénnych substrátov. Cytotoxický účinok na nádorové a nenádorové bunky sa zisťoval na základe MTT testu.

V extraktoch pohánky sa spektrofotometricky stanovil obsah celkových polyfenolov a flavonoidov. Obsah rutínu bol determinovaný pomocou HPLC analýzy s hmotnostnou detekciou.

Výsledky a diskusia: Významné zlepšenia antioxidačných a enzým-inhibičných účinkov sa dosiahli najmä pre deriváty rutínu s mastnými kyselinami, avšak protinádorové efekty boli významnejšie až pri vyšších koncentráciách látok (500 μ M až 1000 μ M).

Spomedzi acylovaných a konjugovaných derivátov kvercetínu nastalo približne u tretiny z nich zlepšenie inhibície enzýmov a cytotoxického účinku na bunky. Najlepšie aktivity dosiahol chloronaftochinón kvercetín, ktorý bol približne trikrát lepší než nemodifikovaný kvercetín.

Takmer pre všetky komplexy kvercetínu sme pozorovali zlepšenie enzým-inhibičných vlastností a cytotoxických účinkov na bunky. Najlepšie výsledky dosiahol komplex s kyselinou kojovou.

Skríning extraktov z 10 odrôd pohánky preukázal, že z hľadiska obsahu profylaktických zložiek ako aj sledovaných účinkov sa ako najvhodnejšie javia odrody pohánky siatej *Bamby* a *Špačinská 1*.

Záver: Pre zlepšenie posudzovaných účinkov sa vhodnou zdá byť lipofilizácia molekuly kvercetínu. Komplexácia je jednoduchšou, rýchlejšou a šetrnejšou metódou prípravy nových substancií než chemická resp. enzýmová derivatizácia. Najvhodnejšie je zamerať sa na prírodné komplexy, kde spoločne fungujú viaceré bioaktívne zlúčeniny, ktoré synergickým spôsobom môžu potencovať príslušné účinky. V tomto smere sa pre aplikačné zámery do praxe ukazuje ako vhodná odroda *Špačinská 1*. Jej šupky boli využité na získanie vodno-etanolových extraktov, s ktorými sa zahájili prípravy testovania na probandoch.

Táto práca vznikla za podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ realizovaním projektu „Hodnotenie prírodných látok a ich výber pre prevenciu a liečbu civilizačných ochorení“ (ITMS 26240220040), Agentúry na podporu výskumu a vývoja realizovaním projektu APVV-0339-10 a Vedeckej grantovej agentúry prostredníctvom projektu VEGA 1/0191/12. Ďakujeme Výskumnému ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch za poskytnutie vzoriek pohánky.

PROTEKTÍVNE ÚČINKY NOVOSYNTETIZOVANÝCH DERIVÁTOV KVERCETÍNU VOČI UVA ŽIARENÍU

Tomáš Heizer¹, Anna Kubičková², Miroslav Veverka³, Roman Hudec², Soňa Jantová²

¹Oddelenie fyzikálnej chémie, Ústav fyzikálnej chémie a chemickej fyziky, FCHPT STU v Bratislave, ²Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU v Bratislave, ³Bel/Novamann International Ltd., Bratislava

Úvod: Flavonoly ako kvercetín patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce flavonoidy v rastlinnej ríši. Je všeobecne známe, že flavonoidy pôsobia ako antioxidanty, lapače voľných radikálov, enzýmové inhibítory, alebo modulátory génovej expresie. Tieto prírodné látky zasahujú do mnohých regulačných dráh, ako je napríklad rast buniek, energetický metabolizmus, apoptóza, transkripcia génov, aktivácia reparačných mechanizmov, modulácia zápalových procesov či stresovej odpovede. Experimenty *in vitro* ako aj *in vivo* naznačili prepojenie účinkov flavonoidov s proliferáciou nádorových buniek, zápalom, angiogenezou, invazívnosťou nádorov a vznikom metastáz z primárnych nádorových ložísk. UVA predstavuje dlhovlnné žiarenie dominantne zastúpené v ultrafialovom spektre slnečného žiarenia dopadajúceho na zemský povrch. Vzhľadom na túto skutočnosť, jeho účinky je možné považovať za majoritného nositeľa toxicity a mutagenity spôsobenej nekontrolovaným vystavením ľudskej pokožky slnečnému žiareniu. V rôznych štúdiách sa zistilo, že kvercetín pri rôznych typoch buniek prejavil schopnosť znížiť účinok UVA-indukovaného oxidačného poškodenia. Takáto aktivita sa zistila aj pri kvercetínových derivátoch. Preto naša štúdia viedla, k sledovaniu protektívneho potenciálu novosyntetizovaných acylovaných derivátov mono a dikvercetínu.

Materiál a metódy: Ako modelový systém sme použili myšacie embryonálne fibroblasty NIH-3T3. Bunky sme kultivovali v DMEM médiu s prídavkom antibiotík a 10% fetálneho hovädzieho séra pri 37°C v 5% atmosfére CO₂.

K 24h hodinovej bunkovej kultúre sme pridali testované deriváty/rozpúšťadlo (0,1%). Jednu hodinu po ich pridaní sme bunkovú kultúru vystavili UVA žiareniu s celkovou dávkou 5,4 J/cm². Cytotoxicitu a proliferáciu buniek sme sledovali pomocou priameho počítania buniek, MTT testom, LDH testom a sledovaním morfológických zmien pomocou svetelného mikroskopu.

Bunkovú smrť a produkciu ROS sme sledovali pomocou gélovej elektroforézy a prietokovej cytometrie. Genotoxicitu sme sledovali pozorovaním vzniku DNA zlomov pomocou jednobunkovej gélovej elektroforézy (comet assay).

Výsledky a diskusia: V našej práci sme študovali protektívne účinky novosyntetizovaných acylovaných derivátov mono a dikvercetínu proti UVA-indukovanej cyto- a genotoxicite. Indukciu cyto- a genotoxicity, sme overili na bunkovej línii NIH-3T3, kde sme sledovali bunkovú smrť, indukciu apoptózy a morfológické zmeny. Na základe výsledkov získaných v primárnom skríningu priamym počítaním buniek, MTT testom a LDH testom sme na podrobnejšie štúdium vybrali dva najúčinnnejšie deriváty - dikvercetín a acetylovaný dikvercetín. Sledovali sme schopnosť oboch derivátov, chrániť bunkovú líniu pred morfológickými zmenami, znížiť tvorbu ROS a dvojvláknových zlomov DNA. Zistili sme, že dikvercetín a acetylovaný dikvercetín indukovali apoptózu, znížili tvorbu ROS indukovanú UVA ako aj množstvo dvojvláknových zlomov DNA, ktoré bolo závislé od použitej látky a jej koncentrácie.

Záver: Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že všetky novosyntetizované deriváty kvercetínu a dikvercetínu prejavili určitý ochranný účinok proti UVA-indukovanému oxidačnému poškodeniu NIH-3T3 buniek. Dva z týchto derivátov, dikvercetín a acetylovaný dikvercetín, boli najúčinnnejšie a prejavili systematické ochranné účinky. Na objasnenie mechanizmu týchto účinkov budú potrebné ďalšie štúdie.

Táto práca bola podporená grantovými agentúrami APVV 0339-10 and VEGA 1/0191/12

INHIBÍTORY HISTÓN DEACETYLÁZ V KOMBINÁCIIS FOTODYNAMICKOU TERAPIOU

Andrea Halaburková, Ján Koval', Rastislav Jendželovský, Jaromír Mikeš, Peter Fedoročko

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Úvod: Dereguláciu epigenetických modifikácií na histónoch a DNA môžu spôsobiť zvýšené hladiny histón deacetyláz zohrávajúcich dôležitú úlohu v tumorigenéze. Preto sa inhibítory histón deacetyláz (HDIs) stávajú skupinou perspektívnych protinádorových liečiv. Fotodynamická terapia (PDT) využíva netoxickú látku – fotosensibilizátor, ktorá sa vo zvýšenej miere akumuluje v nádorových bunkách a po aktivácii svetlom špecifickej vlnovej dĺžky má schopnosť vytvárať reaktívne kyslíkové radikály, spôsobujúce bunkovú smrť a deštrukciu tkaniva. Keďže HDIs spôsobujú dekondezáciu chromatinu a následné sprístupnenie DNA, to dodatočne môže spôsobiť zvýšenie schopnosti kyslíkových radikálov atakovať DNA a tým prispieť k zvýšeniu účinnosti fotochemických a fotobiologických procesov spôsobených počas PDT.

Materiál a metódy: V experimentoch bola použitá nádorová bunková línia ľudského adenokarcinómu hrubého čreva - HT-29. Ako fotosenzibilizátor sme použili hypericín (HYP), sekundárny metabolit ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum* L.). Boli vybraté dve skupiny HDIs - skupina derivátov hydroxamových kyselín: SAHA (suberoylanilid hydroxamová kyselina), VPA (kyselina valproová), a skupina krátkych reťazcov mastných kyselín: TSA (trichostatín A), NaPB (fenylobutyrát sodný). V začiatkových experimentoch boli určené pracovné koncentrácie pomocou testu MTT, ktorým sa hodnotí metabolická aktivita buniek. Pomocou prietokovej cytometrie boli merané zmeny v mitochondriálnom membránovom potenciáli (MMP), ktoré boli analyzované použitím farbenia TMRE (tetrametylrodamínylesterperchlorát) ako aj zmeny viability a metabolickej aktivity, ktoré boli charakterizované použitím dvojitého farbenia FDA (fluoresceín diacetát - farbenie metabolicky aktívnych buniek) a PI (propídium jodid – farbenie mŕtvych buniek). Zmeny celkového počtu buniek v individuálnych skupinách boli vyhodnotené pomocou prístroja Coulter Counter.

Výsledky a diskusia: Analýzou MMP, po aplikácii HDIs a/alebo PDT, sme v skupinách ovplyvnených SAHA a TSA zaznamenali intenzívnejšie zmeny mitochondriálneho potenciálu ako v druhej skupine HDIs, čo môže byť spôsobené tým, že

skupina derivátov hydroxamových kyselín sú pan inhibítory. Podobný priebeh odpovede bol zaznamenaný v rámci jednotlivých skupín HDIs. Zníženie hodnôt mitochondriálneho potenciálu v kombinovaných skupinách bol výraznejší v porovnaní s jednotlivými skupinami HDIs, HYP ako aj ku kontrole. Pri analýze zmien viability a metabolickej aktivity bol pozorovaný výraznejší pokles populácie živých buniek a nárast mŕtvej subpopulácie buniek v kombinovaných skupinách na 24 hod a s výraznejším efektom derivátov hydroxamových kyselín na 48 hod po PDT. Analýza celkového počtu buniek po zásahu HYP a HDIs samostatne (okrem VPA = 0,5 mM) ukázala signifikantné zníženie celkového počtu buniek a zvýšenie počtu plávajúcich buniek. Najvýznamnejší pokles bol zaznamenaný v skupinách s kombinovanou terapiou HDIs a PDT.

Záver: Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že HDIs sú schopné modifikovať a zvýšiť cytotoxický účinok fotodynamickej terapie s hypericínom v bunkách HT- 29 *in vitro*. Pretože molekulárne mechanizmy HY-PDT v kombinácií s účinkom HDIs na nádorové bunky nie sú objasnené, chceme prispieť k získaniu ďalších poznatkov s cieľom možného zvýšenia efektivity týchto dvoch rozličných protinádorových mechanizmov.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0040-10, Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0626/11a VV-PF-79.

HYPERICÍN AKO LÁTKA S MOŽNÝM NEGATÍVNÝM VPLYVOM NA ÚČINOK CHEMOTERAPEUTÍK

Zuzana Jendželovská, Rastislav Jendželovský, Lucia Hiľovská, Ján Koval', Jaromír Mikeš, Peter Fedoročko

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Úvod: Jednou z častých príčin zlyhania protinádorovej liečby je vznik rezistencie nádorových buniek voči aplikovanému chemoterapeutiku. Je známe, že množstvo prírodných látok obsiahnutých v liečivých bylinách, je schopných modulovať aktivitu niektorých mechanizmov rezistencie. Jednou z nich je aj ľubovník bodkovaný (*Hypericum perforatum* L.), ktorého extrakty sa vo vysokej miere užívajú na zmiernenie depresí, nespavosti a úzkostí. Viacero prác potvrdilo, že za komplikácie a zlyhanie niektorých terapeutických prístupov je zodpovedný hyperforín, jeden zo sekundárnych metabolitov ľubovníka. Indukciou viacerých cytochróm P450 monooxygenáz a ABC transportnej pumpy P-gp je schopný výrazne znížiť biologickú dostupnosť niektorých súčasne podaných liečiv. Naše predchádzajúce výsledky však poukazujú na hypericín ako na ďalší metabolit schopný modulovať hladinu a aktivitu ABC transportných proteínov MRP1 a BCRP. To nastolilo predpoklad, že hypericín by mohol zmierniť účinok cytostatík prostredníctvom aktivácie ABC transportných proteínov. Preto bolo naším cieľom analyzovať vplyv predinkubácie buniek s hypericínom na účinok cisplatiny (CDDP; potenciálny substrát MRP1, MRP2) a mitoxantrónu (MTX; substrát BCRP) a overiť tak predpoklad navodenia rezistencie voči týmto cytostatikám.

Materiál a metódy: Ako experimentálny model boli použité bunkové línie ľudskeho ovariálneho adenokarcinómu (A2780 – senzitívna voči CDDP; A2780cis – rezistentná voči CDDP) a ľudskej promyelocytovej leukémie (HL-60 – senzitívna voči MTX; cBCRP – rezistentná voči MTX). Vplyv hypericínu na účinok cytostatík bol stanovený prostredníctvom zmien metabolickej aktivity buniek (MTT test) a zmien v incidencii bunkovej smrti prietokovou cytometriou (analýza poklesu mitochondriálneho membránového potenciálu, externalizácie fosfatidylserínu a viability). Pomocou prietokovej cytometrie bola stanovená aj intracelulárna hladina hypericínu.

Výsledky a diskusia: Významný nárast metabolickej aktivity a redukcia subpopulácie apoptotických a nekrotických buniek poukazujú na schopnosť hypericínu zmierniť, respektíve oddialiť nástup cytotoxického účinku CDDP aj MTX. Kým negatívny vplyv hypericínu na

účinok CDDP sme zaznamenali aj v senzitivných (A2780) aj v rezistentných (A2780cis) bunkách, k zníženiu cytotoxicity MTX došlo iba v bunkách HL-60. V prípade rezistentnej bunkovej línie cBCRP však hypericín vyvolal opačný efekt – došlo k zosilneniu účinku MTX. Tieto výsledky sú zaujímavé aj z hľadiska akumulácie hypericínu v bunkách. Kým v bunkách A2780cis a HL-60 sme namerali markantný nárast obsahu hypericínu, jeho intracelulárna hladina bola v bunkách A2780 a cBCRP niekoľkonásobne nižšia. Na základe daných výsledkov sme zistili, že pokles akumulácie hypericínu v bunkách koreluje s vysokou hladinou transportného proteínu BCRP. To podporuje predpoklad, že hypericín by mohol predstavovať potenciálny substrát tejto pumpy. Pre objasnenie mechanizmov zodpovedných za zmenu odpovede buniek na CDDP/MTX sú však nevyhnutné ďalšie analýzy.

Záver: Výsledky tejto štúdie poukazujú na hypericín ako na biologicky aktívny rastlinný metabolit schopný ovplyvniť účinok niektorých cytostatík. Je tiež pravdepodobné, že hypericín by mohol do určitej miery interagovať s mechanizmami, ktoré regulujú biologickú dostupnosť liečiv v organizme. Dosiahnuté výsledky by tak mohli prispieť k odhaleniu negatívnych liekových interakcií zodpovedných za komplikácie v liečbe nádorových aj iných ochorení.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0040-10, Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0626/11 a Nadáciou výskum rakoviny č. O-12-102/0001-00.

POTENCIÁLNE INHIBÍTORE GLUKOZYLCERAMID SYNTÁZY A VIABILITA BUNIEK

Katarína Turáková¹, Boris Lakatoš¹, Dušan Berkeš², Daniela Moravčíková², Andrej Ďuriš²

¹Oddelenie biochémie a mikrobiológie FCHPT STU v Bratislave, ²Oddelenie organickej chémie FCHPT STU v Bratislave

Úvod: Ca²⁺ sú všestranné intracelulárne ióny podieľajúce sa na regulácii mnohých bunkových procesov. Udržiavanie homeostázy Ca²⁺ je pre bunku preto veľmi dôležité, nakoľko jej akékoľvek narušenie môže vyvolať nežiaduce odpovede, bunkovú smrť nevynímajúc. Za istých situácií je však jej narušenie potrebné pre spustenie programovanej smrti buniek, ktorá prebieha v prospech ochrany celého organizmu. Typ programovanej bunkovej smrti, ku ktorého spusteniu dôjde je úzko spätý so zmenami v intracelulárnej koncentrácii vápenatých iónov. K týmto môže dochádzať aj pri hromadení glykosfingolipidov v dôsledku poruchy ich metabolizmu. Príkladom je Gaucherova choroba, teda hromadenie glukozylceramidu (Glc-Cer), prekursoru mnohých ďalších glykosfingolipidov. Glc-Cer vzniká z UDP-glukózy a ceramidu pomocou glukozylceramid syntázy (GCS). Ceramid, ako centrálna molekula metabolizmu sfingolipidov, vo všeobecnosti vyvoláva antiproliferatívne odpovede bunky, ako je zastavenie rastu bunky, indukcia apoptózy, starnutie, stres endoplazmatického retikula, či autofágiu. Cieľom práce bolo sledovať účinok nových derivátov 1-fenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanolu (PPMP), známeho inhibítora GCS. Efekt týchto látok na transport vápenatých iónov, viabilitu buniek a samotnú aktivitu GCS bol sledovaný na myšiacích tymocytoch.

Materiál a metódy: Tymocyty boli izolované tesne pred experimentom z myší starých 4 až 8 týždňov. Transport Ca²⁺ bol sledovaný pomocou flourescenčnej sondy Fluo 3-AM na spektrofouometri Flouromax 4 po dobu 15 minút od pridania Ca²⁺ (výsledná koncentrácia 2,5 mmol/l). Viabilita buniek bola stanovená prietokovou cytometriou. Aktivita GCS bola stanovená *in vitro* pomocou NBD-C12-ceramidu z extraktov lipidov, ktoré boli získané po 2, 6 a 12 hodinovej kultivácii tymocytov v prítomnosti potenciálnych inhibítorov GCS s koncentraciou 1 μmol/l a 10 μmol/l. Extrakty boli nanosené na HPTLC silikagél 60 F₂₅₄ platne, vyvíjané v zmesi chloroform:metanol: amoniak 20% (70:30:6,25, v/v/v) a flourescenčne analyzované pomocou Typhoon 9210.

Výsledky a diskusia: Účinok sledovaných látok na transport Ca²⁺ bol závislý na ich štruktúre, koncentrácii a tiež na dobe pôsobenia. Pri niektorých bol zaznamenaný výrazný

inhibičný vplyv už pri 15 minútovej predinkubácii buniek (DM-744 (3, 10 a 30 nmol/l), AD679 (100 nmol/l) a KC75 (10 nmol/l), naopak niektoré pôsobili mierne stimulačne a niektoré boli bez účinku aj po dlhšie trvajúcim pôsobení. Efekt látok na transport Ca^{2+} však málo súvisel so zmenou v aktivite GCS, ktorá bola najviac ovplyvnená po prídavku AD648 (10 $\mu\text{mol/l}$), AD679 (10 $\mu\text{mol/l}$), AD725 (10 $\mu\text{mol/l}$) a AD733 (1 $\mu\text{mol/l}$). 2 a 6 hodinová kultivácia buniek so sledovanými látkami nespôsobila zmeny vo viabilite tymocytov v porovnaní s kontrolným meraním. K pozorovateľným zmenám došlo po 12 hodinovej kultivácii.

Záver: Účinok potenciálnych inhibítorov sa líšil v závislosti od ich štruktúry a od času kultivácie buniek v ich prítomnosti. Efekt na transport Ca^{2+} bol závislý aj na koncentrácii jednotlivých derivátov, avšak nie vždy bol lineárny. Typ bunkovej smrti bol porovnávaný s účinkami známych látok. Vo väčšine prípadov sledované látky vyvolávali nekrozu, ale ich účinok nebol nutne spojený so zmenami v transporte Ca^{2+} resp. so zmenou v aktivite GCS.

Tento projekt bol podporený grantovou agentúrou VEGA č. 01/0471/11 a 01/0441/11

VPLYV TANESPIMYCÍNU, PIFITRÍNU- μ A METYLÉNOVEJ MODREJ NA PREŽÍVANIE A CHEMOSENZITIVITU U HL-60 A K-562.

Katarína Kliková¹, Andrea Štefaniková¹, Ivana Pilchová¹, Katarína Klačanová¹, Jozef Hatok¹, Peter Račay¹

¹Ústav lekárskej biochémie, JLF UK, Martin

Úvod: Jedným z možných mechanizmov, kedy leukemická bunka uniká pred kaspázovo-závislou apoptózou sú zvýšené hladiny antiapoptotických bielkovín, čo vedie k participácii týchto bielkovín na onkogenéze, zvýšení proliferácie a znížení citlivosti leukemických buniek na cytostatickú liečbu. Bielkoviny tepelného šoku (HSPs), akými sú Hsp70 a Hsp90, môžu potlačiť apoptózu priamou väzbou s apoptickými molekulami (napr. cytochróm c, AIF, Bax). Existuje preto niekoľko možností ako inhibovať expresiu alebo funkcie Hsp70 a Hsp90 v leukemických bunkách. Do skupiny inhibítorov Hsp70 môžeme zaradiť pifitrín- μ (PFT- μ) viažuci sa na C-terminálnu doménu a metylénovú modrú (MM) viažucu sa na N-terminálnu doménu bielkoviny. Do skupiny inhibítorov Hsp90 patrí tanespimycín (17-AAG). Jeho účinok je spojený s degradáciou klientských bielkovín, blokovaním bunkového cyklu a indukciou apoptózy.

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv inhibítorov Hsp70 a Hsp90 na prežívanie a citlivosť leukemických buniek HL-60 a K-562 ako aj na hladiny vybraných bielkovín.

Materiál a metódy: V experimentoch sme používali bunkovú líniu odvodenú od akútnej myeloidnej leukémie HL-60 a od chronickej myeloidnej leukémie K-562. Bunky HL-60 ($0,5 \times 10^6$ b/ml) boli kultivované v kultivačnom médiu IMDM s obsahom 20% FBS, 1% PNC/STR a 1% GENT. Bunky K-562 ($0,2 \times 10^6$ b/ml) boli kultivované v kultivačnom médiu IMDM s obsahom 10% FBS, 1% PNC/STR a 1% GENT pri 37°C a 5% CO₂. Prežívanie a citlivosť leukemických buniek po pôsobení rôznych koncentrácií PFT- μ , MM a 17-AAG sme sledovali pomocou MTT testu. Inhibítory boli použité buď samostatne, v ich kombinácii alebo v kombinácii s vybranými druhmi cytostatík (cytarabín, daunorubicín a mitoxantrón). Bielkoviny boli izolované z kontrolných a opracovaných buniek TRI Reagentom® podľa protokolu výrobcu (Molecular Research Center, USA). Zmeny v hladinách vybraných bielkovín sme sledovali westernblotovou analýzou.

Výsledky a diskusia: Na základe MTT testu sme zistili, že MM pri 0,5 μ mol/l, PFT- μ pri 17,5 μ mol/l a 17-AAG pri 5 μ mol/l a vyšších koncentráciách viedli k významnému zníženiu relatívneho prežívania HL-60 už po 24 hodinách. Po 48 hodinovom pôsobení MM s 2,5 μ mol/l 17-AAG došlo k potlačeniu účinku MM tanespimycínom, pretože došlo

k zvýšeniu prežívania buniek HL-60. MM (0,5 $\mu\text{mol/l}$) viedla k zvýšenej citlivosti HL-60 na daunorubicín avšak nemala vplyv na citlivosť buniek HL-60 na ďalšie sledované cytostatiká. PFT- μ (10 $\mu\text{mol/l}$) nemal vplyv na citlivosť buniek HL-60 na sledované cytostatiká. Po 24 hod. pôsobení MM s koncentráciami 0,25; 0,5 a 1 $\mu\text{mol/l}$ sme detegovali zníženú hladinu bielkoviny Hsp70. Po 24 hod. pôsobení 17-AAG s koncentráciou 10 $\mu\text{mol/l}$ sme detegovali zníženú hladinu bielkoviny Hsp90 α/β na druhej strane došlo k významnému zvýšeniu hladiny Hsp70. Výsledky z leukemickej línie HL-60 boli porovnávané s leukemickou líniou K-562.

Záver: Cieľom súčasného biomedicínskeho výskumu je, okrem iného, objasniť mechanizmus rezistencie leukemických buniek na cytostatiká ako aj vývoj nových liečiv a postupov. Ukazuje sa, že jednou z možných perspektív liečby hematologických ochorení myeloidného radu je využitie inhibítorov HSP samostatne alebo v kombinácii s inými terapeutikami.

Táto práca vznikla za podpory projektu APVV-0245-11.

SMRŤ BUNIEK HL-60 INDUKOVANÁ BUTYRÁTOM SODNÝM JE URÝCHLENÁ ABT-737

Andrea Štefaniková, Katarína Kliková, Jozef Hatok, Peter Račay

Ústav lekárskej biochémie, JLF UK v Martine

Úvod: Cieľom uvedenej štúdie bolo sledovať efekt butyrátu sodného (NaBu) v kombinácii s ABT-737 na prežívanie buniek leukemickej bunkovej línie HL-60. Zamerali sme sa na kinetiku pôsobenia obidvoch látok. Zároveň sme analyzovali vplyv NaBu na hladiny vybraných bielkovín Bcl-2 rodiny v závislosti od času a koncentrácie NaBu.

Materiál a metódy: Bunky bunkovej línie HL-60 boli kultivované v kultivačnom médiu IMDM s 20% FBS pri 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Pre potreby experimentu boli bunky kultivované počas stanovených časových intervalov s príslušnými koncentraciami inhibítorov NaBu a/alebo ABT-737. Prežívanie buniek bolo hodnotené prostredníctvom MTT testu. Bunkový cyklus buniek HL60 značených propidium iodidom bol analyzovaný prietokovým cytometrom FACS Canto II. Určeniu hladín vybraných bielkovín pomocou špecifických protilátok predchádzala SDS-PAGE elektroforéza na 12% géle a semi-dry western blotting.

Výsledky a diskusia: Prežívanie buniek HL-60 bolo signifikantne znížené po 48 h inkubácii s 2 a 5 mmol/l NaBu. Avšak pri kombinácii 1 μmol/l ABT-737 s 2 a 5 mmol/l NaBu došlo k signifikantnému zníženiu prežívania už po 24 h. Analýza bunkového cyklu ukázala, že 1 mmol/l NaBu po 48 a 72 h úplne zastavil bunky v G1 fáze, zároveň bolo vidieť postupné ubúdanie buniek v S a G2 fáze. Pri 2 a 5 mmol/l NaBu sme pozorovali ubúdanie buniek v S-fáze a nárast G2 fázy. Neskôr sme pozorovali, že najskôr odumierali bunky naakumulované v G2 fáze a až potom v G1 fáze. Kombinácia 1 μmol/l ABT-737 s 1 mmol/l NaBu inhibovala rast buniek, zastavila ich v G1 fáze bunkového cyklu a oneskorila nástup bunkovej smrti spôsobenej ABT-737. Ďalej inkubácia buniek HL-60 s 1 μmol/l ABT-737 v kombinácii s 2 a 5 mmol/l NaBu spôsobila masívny nárast odumierajúcich buniek prítomných už po 24 h. Western blotová analýza po inkubácii buniek HL-60 s NaBu ukázala zvýšenú hladinu proapoptotického Bim_{EL} a znížené hladiny anti-apoptotických bielkovín Bcl-2 rodiny ako aj GRP78, ktorý je spájaný s odpoveďou na stres endoplazmatického retikula.

Záver: NaBu samostatne aj v kombinácii s ABT-737 zastavuje rast buniek HL60 a indukuje ich smrť. ABT-737 umocňuje NaBu sprostredkovanú smrť, čo je viditeľné už po 24 h. ABT-737 sprostredkovaná smrť buniek je rýchla (24 h) tým, že ABT-737 inhibuje funkciu anti-apoptotických bielkovín. Naproti tomu NaBu spôsobuje zníženie hladín anti-apoptotických bielkovín, čoho efekt je viditeľný neskôr (48 h). Synergický efekt môže byť v skorých štádiách inkubácie spôsobený nárastom hladiny Bim_{EL}.

Táto práca bola podporená projektom: „Podpora rozvoja ľudských zdrojov s využitím najmodernejších postupov a foriem vzdelávania na JLF UK v Martine“ spolufinancovaného zo zdrojov EÚ a Európskeho sociálneho fondu.

Sekcia II

Biochémia a biofyzika biologických membrán

VPLYV ANIÓNOVÝCH FOSFOLIPIDOV NA FUNKCIU MITOCHONDRIÍ V KVASINKE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Mária Balážová

Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji

Úvod: Aniónové mitochondriálne fosfolipidy, kardiolipín (CL) a fosfatidylglycerol (PG), majú nezastupiteľnú úlohu v bioenergetike bunky, udržiavaní stability mtDNA, regulácii biosyntézy bunkovej steny, regulácii exprese jadrových génov i iniciácii apoptózy. Na významnosť funkcie týchto fosfolipidov poukazuje aj prítomnosť PG špecifickej fosfolipázy C, Pgc1p (Šimočková a kol., 2008), ktorá kontroluje množstvo PG, intermediátu biosyntetickej dráhy CL. Otázka úlohy Pgc1p vo fyziológii kvasinky *S. cerevisiae* však zostáva stále otvorená.

Materiál a metódy: Kvantifikácia fosfolipidového zloženia bola robená pomocou rádioaktívneho značenia lipidov. Kmene boli zaočkované do syntetického média bez inozitolu a cholínu (5 ml) s prídavkom 5 μCi [^{32}P] kyseliny fosforečnej/ml. Bunky boli pestované 5-6 generácií do strednej až neskorej exponenciálnej fázy rastu za trepania pri 28°C. Lipidy boli extrahované, separované pomocou TLC, vizualizované fosfoimagerom a kvantifikované Quantity One softvérom (BioRad). Meranie rýchlosti respirácie prebiehalo na Clarkovej kyslíkovej elektróde (Hansatech) podľa postupu uvedenom v Koshkin a Greenberg, 2002.

Výsledky a diskusia: Charakteristickou črtou mutantného kmeňa *pgc1Δ* je akumulácia PG. Podobné hromadenie PG bolo zaznamenané aj v kmeni, ktorému chýbal gén pre syntézu CL, *CRD1* (Tuller a kol., 1998). Táto akumulácia bola však dôsledkom zablokovania spotreby PG na tvorbu CL a nie dôsledkom narušenej degradácie PG, ako je tomu u kmeňa *pgc1Δ*. Preto nás zaujímalo, čo nastane v prípade spoločnej delécie dvoch génov *CRD1* a *PGC1*. V dvojitom mutante *crd1Δ pgc1Δ* sme pozorovali dvojnásobne vyšší obsah PG ako u mutantu *pgc1Δ* alebo *crd1Δ*. Meraním rýchlosti respirácie v mutante *crd1Δ* bolo zistené, že kmeň bez CL a s akumulovaným PG je defektný v oxidatívnej fosforylácii (Koshkin a Greenberg, 2002). Poškodenú respiráciu sme pozorovali i u kmeňa *pgc1Δ*, ale iba pod podmienkami zvýšenej akumulácie PG, teda za neprítomnosti inozitolu. U dvojitého mutantu *crd1Δpgc1Δ* bola nameraná podobná rýchlosť respirácie ako u *crd1Δ*. Tieto pozorovania naznačujú, že nielen strata CL, ale už aj zvýšená akumulácia PG môže spôsobiť respiračné problémy mitochondrií. Taktiež poukazujú na dôležitosť PG špecifickej fosfolipázy C v kvasinke *S. cerevisiae* v udržiavaní optimálneho množstva PG

v mitochondriálnych membránach.

Záver: Záverom možno konštatovať, že regulačný mechanizmus degradácie mitochondriálnych aniónových fosfolipidov je vysoko kontrolovaný. Lepšia znalosť procesov, ktoré regulujú homeostázu fosfolipidov, môže pomôcť k pochopeniu základných funkcií bunky. Detailné poznanie mechanizmov regulujúcich homeostázu mitochondriálnych lipidov u modelových eukaryotických organizmov môže tiež prispieť k pochopeniu molekulárnych mechanizmov etiológie niektorých ľudských ochorení, medzi ktoré patria rôzne mitochondriálne neuropatie a myopatie, ale napríklad aj závažné respiračné ochorenia spojené so zmenami pľúcneho surfaktantu, ktorého dôležitou zložkou je práve PG.

Literatúra: Koshkin, V. and Greenberg, M.: *Biochem. J.*, 364, (2002)

Šimočková, M., Holič, R., Tahotná D., Patton-Vogt J., Griač, P.: *J. Biol. Chem.*, 283 (25), (2008)

Tuller, G., Hrastnik, C., Achleitner, G., Schiefthaler, U., Klein, F. and Daum, G.: *FEBS Lett.*, 421, (1998)

Práca bola podporená grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja LPP-0291-09.

VPLYV SYNTÉZY NEUTRÁLNYCH LIPIDOV NA SEKRÉCIU MASTNÝCH KYSELÍN U KVASINKY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Peter Seč, Roman Holič

Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, 900 28 Ivanka pri Dunaji,

peter.sec@savba.sk

Úvod: V bunkách kvasiniek sa mastné kyseliny (MK) ukladajú vo forme neutrálnych zásobných lipidov (triacylglycerolov a sterolestero) do lipidových partikul (LP). Syntézu zásobných lipidov u kvasiniek umožňujú štyri gény: *DGA1*, *LRO1*, *ARE1* a *ARE2*. Ak sú v kvasinke všetky štyri gény deletované, kvasinka nie je schopná tvoriť LP a vzniká štvoritý mutant – QM bez LP. Tento kmeň nedokáže ukladať nadprodukované ani prijaté MK do zásobných lipidov. Bolo by preto zaujímavé zistiť, či kvasinky namiesto ukladania MK sú schopné ich sekretovať do kultivačného média. Je známe, že delécie v génoch *FAA1* a *FAA4* umožňujú kvasinke sekretovať MK von z bunky, ale existujú iba značne limitované poznatky o mechanizme sekrecie v kvasinkách. Naším cieľom bolo otestovať hypotézu, že sekretujúce kmene bez LP, sú schopné vo vyššej miere MK vysekretovať, oproti kmeňom so sekrečným fenotypom s LP.

Materiál a metódy:

BY4742 + YCplac33

BY4742 *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33

BY4742 QM + YCplac33

BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33

BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*DGA1*

BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*LRO1*

Použité kmene

Legenda: *QM* – štvornásobný kvasinkový mutant, deletované gény sú: *DGA1, LRO1, ARE1, ARE2*.

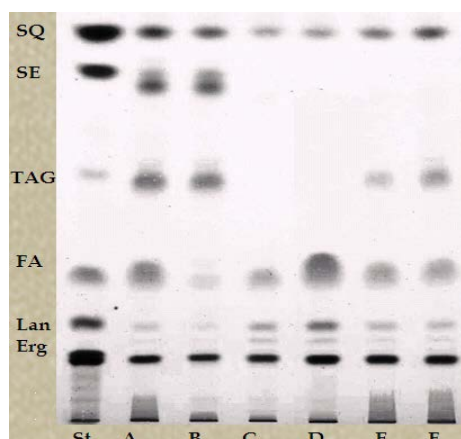
FAA1 a FAA4 – gény zodpovedné za sekreciu MK do kultivačného média

YCplac33 – kvasinkový centromerový plazmid a *HIS3, LYS2* – histidínový, lyzínový selekčný marker

Metódy: Na meranie intenzity zákalu média spôsobeného vysekretovanými MK bol využitý spektrofotometer. Na delenie neutrálnych lipidov bola použitá metóda tenkovrstvovej chromatografie (TLC) a MK boli analyzované pomocou plynovej chromatografie (GC).

Výsledky a diskusia: Z TLC analýzy možno pozorovať profil neutrálnych lipidov v použitých kmeňoch. Potvrdil sa predpoklad, že štvoritý mutanty (QM) *dga1, lro1, are1, are2* bez LP (Obr.1), netvorí TAG ani sterolestery. Overili sme, že sekretujúci kmeň bez LP s vloženým génom *DGA1* (Obr. 1 - E) a sekretujúci kmeň bez LP s vloženým génom *LRO1* (Obr.1 - F), začínajú formovať triacylglyceroly (TAG), ktoré pravdepodobne ukladajú do

lipidových partikul. Výsledky tiež naznačujú, že v bunkách kmeňa bez LP so sekrečným fenotypom (Obr.1 – D) sa zároveň hromadia vysoké hladiny MK.



Obr.1: TLC analýza neutrálnych lipidov v bunkách

A. BY4742 + YCplac33

B. BY4742 *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33

C. BY4742 QM + YCplac33

D. BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33

E. BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*DGA1*

F. BY4742 QM *faa1::HIS3, faa4::LYS2* + YCplac33-*LRO1*

St. Štandardy neutrálnych lipidov

Spektrofotometrické merania nám umožnili orientačne sledovať hladiny sekretovaných mastných kyselín pričom intenzita zakalenia média reprezentuje množstvo

sekretovaných MK do média. Analýza MK pomocou GC nám umožnila sledovať rozdiely v množstvách a profiloch vysekretovaných MK skúmaných kmeňov. Tieto dáta budú prezentované a diskutované na konferencii.

Záver: Získané výsledky potvrdzujú predpoklad, že kmene bez LP so sekrečným fenotypom sekretujú mastné kyseliny vo vyššej miere ako sekrečné kmene s LP. Zároveň výsledky poukazujú na zaujímavý fakt, že sekretujúce kmene bez LP s vloženými génmi pre syntézu TAG, sekretujú MK výraznejšie ako sme predpokladali. Lepšie porozumenie vplyvu syntézy neutrálnych lipidov na sekréciu mastných kyselín si však vyžaduje ešte ďalšie skúmanie.

ŠTÚDIUM VPLYVU NADEXPRESIE P-GLYKOPROTEÍNU NA ZMENY ZLOŽENIA POVRCHOVÝCH SACHARIDOV V LEUKEMICKÝCH BUNKÁCH L1210

Hano Milan, Šereš Mário, Pavlíková Lucia, Bubenčíková Tatiana, Sulová Zdena, Breier Albert

Ústav Molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Akútna lymfocytárna leukémia (ALL) patrí do skupiny zhubných neoplastických ochorení, ktoré je charakteristické nekontrolovateľným nárastom lymfocytov a ich prekursorov v krvi. Pri tomto ochorení predstavuje chemoterapia dominantný spôsob liečby. Táto však môže spôsobiť nadexpresiu membránových transportérov zo skupiny ABC-proteínov, ktoré participujú na vzniku fenotypu viacliekovej rezistencie (multidrug resistance – MDR), čím efektívne limituje účinnosť liečby. P-glykoproteín (P-gp.) je 140 kDa polypeptid, patrí k hlavným predstaviteľom týchto transportérov. Vyznačuje sa masívnou glykozyláciou na prvej extracelulárnej slučke, pričom jeho veľkosť vzrastá na 170 kDa. Glykozylácia proteínov, vrátane P-gp., hrá významnú úlohu pri „kontrole kvality“ novo nasynetizovaného proteínu v endoplazmatickom retikule, alebo pri procese skladania a transportu do cieľovej štruktúry. Cieľom predloženej práce bolo štúdium vplyvu inhibítorov glykozylácie a deglykozylačných enzýmov na zmenu sacharidového zloženia povrchu cytoplazmatickej membrány leukemických buniek L1210 pri rozvoji MDR.

Materiál a metódy: V experimentoch boli použité leukemické bunky línie L1210, a to senzitívna parentálna línia (S), rezistentná, u ktorej bola overexpresia P-gp. navodená adaptáciou na vinkristín (R) (Poleková a kol. 1992), transfekovaná línia (T), ktorá bola získaná stabilnou transfekciou plazmidom nesúcim gén pre ľudský P-gp. (Šereš a kol. 2010). Bunky boli kultivované pri 37 °C, v atmosfére 5 % CO₂ 48 hodín v RPMI médiu s prídavkom fetálneho hovädzieho séra a antibiotika geneticín. Zastúpenie glykoproteínov vo frakciách membránových proteínov sme sledovali pomocou kitu na detekciu glykoproteínov (*DIG glycan detection kit*). Sledovali sme vplyv deglykozylačných enzýmov N-glykozidázy F a Endoglykozidázy H, alebo inhibítorov N-glykozylácie (tunikamycínu) a O-glykozylácie (2-acetamid-2-deoxy- α -D-galaktopyranozidu) na väzbou lektínov GNA a ConA na povrch buniek. Prínomnosť P-gp. v membránach sme overovali väzbou anti-Pgp protilátky C219 a glykozylačný status pomocou lektínu GNA. Aglutinácia natívnych buniek po ovplyvnení jednotlivými látkami bola zaznamenaná prístrojom CASY TT. Pomocou prietokovej cytometrie sme merali intenzitu väzby FITC značených lektínov na povrch buniek po

ovplyvení deglykozidázami a vstup buniek do apoptózy po predinkubácii s jednotlivými inhibítormi pomocou anexín V/PI kitu.

Výsledky a diskusia: V prípade P-gp. pozitívnych buniek (R,T) sa na nám podarilo detekovať úplnú stratu väzby GNA na proteín s Mr = 170 kDa po deglykozyllácii En. H, čo pravdepodobne predstavuje odštiepenie vysokomanozylovaného oligosacharidu z molekuly P-gp. Lektín GNA sa viaže v zvýšenej miere na všetky testované sublínie buniek L1210 viac ako ConA, napriek slabej schopnosti aglutinovať bunky. Tunikamycín blokuje N-glykozylláciu P-gp. u oboch P-gp. sublíniach, ktoré ho obsahujú. Zarážajúce je, že pritom nemá vplyv na transportnú aktivitu ani lokalizáciu P-gp. v membráne. U inhibítora O-glykozyllácie sme nezaznamenali výraznejší efekt.

Záver: Výsledky naznačujú, že v štruktúre P-gp. u P-gp. pozitívnych buniek (R,T) sa nachádza glykozylačné miesto s vysokomanozylovaným oligosacharidovým zvyškom dostupné pre En H. N-glykozyllácia P-gp. nemusí mať esenciálny význam pre maturáciu a funkčnosť P-gp..

Citácie: Poleková L., Barančík M., Mrázová T., Pirker R., Wallner J., Sulová Z., Breier A.: Adaptation of mouse leukemia cells L1210 to vincristine. Evidence for expression of P-glycoprotein. (1992): Neoplasma 39: 73–77.

Šereš M., Ditte P., Breier A., Sulová Z.: Effect of thapsigargin on P-glycoprotein-negative and P-glycoprotein-positive L1210 mouse leukaemia cells. (2010): Gen Physiol Biophys 29(4): 396-401.

Tento projekt je financovaný z grantov APVV-0290-10 a 0282-11, VEGA2/0123/10, 2/0100/12 and Centrum excelentnosti pre Glykomiku, ITMS 26240120031, Operačný program pre výskum a vývov podporený ERDF.

TETRASPANÍN-13 MODULUJE AKTIVITU $\text{Ca}_v2.2$ KANÁLA

Lucia Lichvárová¹, Robert Mallmann², Thomas Wilmes², Jan Castonguay², Norbert Klugbauer², Ľubica Lacinová¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Bratislava, ²Ústav experimentálnej a klinickej farmakológie a toxikológie, Univerzita Alberta-Ludwiga Freiburg, Nemecko

Úvod: Napät'ovo-závislé vápnikové kanály $\text{Ca}_v2.2$ typu zohrávajú kľúčovú úlohu v nervovom systéme pri Ca^{2+} -závislom uvoľňovaní neurotransmiterov. Mnohé proteíny v plazmatickej membráne interagujú s $\text{Ca}_v2.2$ kanálmi a môžu rôznym spôsobom regulovať ich aktivitu. Skrínig cDNA knižníc umožňuje odhaliť doteraz neznáme proteín-proteínové interakcie. Na vyhľadanie nových interakčných partnerov $\text{Ca}_v2.2$ kanálov v presynaptickej membráne sme skrínili cDNA knižnicu myšacieho mozgu. Špecifickým „split-ubiquitin“ systémom sme identifikovali viacero proteínov, ktoré interagovali s $\text{Ca}_v2.2$ kanálmi. Z nich sme vybrali tetraspanin-13 (TSPAN-13), ktorý patrí do rodiny membránových proteínov so štyrmi transmembránovými segmentami, dvomi extracelulárnymi slučkami a konzervovanými CCG motívami. Tetraspanínom obohatené mikrodomény sú zapojené do mnohých bunkových procesov, migrácie buniek, intracelulárneho transportu, bunkovej fúzie a signalizácie. Interakcia tetraspanínu a napät'ovo-závislých vápnikových kanálov doteraz nebola opísaná.

Materiál a metódy: Na vyhľadanie interakčných partnerov sme využili komerčný kit „Split-ubiquitin“ systém (DUALmembrane kit 3) s cDNA knižnicou z myšieho mozgu (pNubGx), zakúpený od Dualsystems Biotech (Zürich, Švajčiarsko). Bunkovú líniu CHO stabilne transfekovanú $\text{Ca}_v2.2$ kanálmi sme kotransfekovali buď kontrolným pEGFP plazmidom alebo pEGFP plazmidom s vloženým génom pre TSPAN-13. Ba^{2+} a Ca^{2+} prúdy v CHO bunkách sme merali metódou patch clamp v konfigurácii z celej bunky za použitia EPC-10 zosilňovača (Electronic HEKA, Lambrecht, Nemecko). Extracelulárny roztok obsahoval: 10 mM BaCl_2 , 10 mM HEPES, 5 mM glukózy, 125 mM TEA-Cl, pH 7,4 (TEA-OH). Na meranie Ca^{2+} prúdu sme BaCl_2 nahradili 2 mM CaCl_2 . Intracelulárny roztok obsahoval: 110 mM CsCl, 10 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 , 3 mM $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0,6 mM Tris-GTP, 10 mM HEPES, pH 7,2 (CsOH). Pipety boli vyrobené z borosilikátového skla (Sutter Instrument, Novato, USA). Dáta boli zaznamenávané softvérom PatchMaster 2.43 a analyzované softvérom FitMaster 2.60 a Origin 8.5. Dáta získané z kontrolných a TSPAN-13 transfekovaných buniek boli štatisticky porovnávané nepárovým Studentovým t-testom.

Výsledky a diskusia: Transfekcia s TSPAN-13 má za následok zníženie prúdovej hustoty a signifikantne zrýchľuje kinetiku aktivácie aj inaktivácie Ba^{2+} prúdu. Inaktivácia Ca^{2+} prúdu cez $\text{Ca}_v2.2$ kanál nebola významne ovplyvnená TSPAN-13. Zrýchlená napät'ovo-

závislá inaktivácia naznačuje, že TSPAN-13 môže mať vplyv na kumulatívnu inaktiváciu počas tzv. burstu akčných potenciálov. Celková inaktivácia na konci série akčných potenciálov alebo na konci vysokofrekvenčnej série krátkych depolarizačných impulzov bola skutočne zvýšená TSPAN-13, aj keď tento účinok nebol štatisticky významný. Koexpresia TSPAN-13 s $Ca_v2.2$ kanálmi nezmenila facilitáciu predpulzom, z čoho môžeme usudzovať, že TSPAN-13 neovplyvňuje moduláciu $Ca_v2.2$ kanálov G-proteínmi.

Záver: Elektrofyzikálne analýzy ukázali, že TSPAN-13 špecificky moduluje aktivitu $Ca_v2.2$ kanálov. Táto modulácia by mohla predstavovať nový mechanizmus regulácie aktivity $Ca_v2.2$ kanála v priestore synaptickej membrány a ovplyvňovať presynaptické uvoľňovanie neurotransmiterov.

Práca bola podporená Agentúrou pre vedu a výskum kontraktom APVV-0212-10 a nemeckým grantom DFG, SFB 780 projekt A1.

INTERAKCIA H₂S S S-NITRÓZOGLUTATIÓNOM - VPLYV pH, O₂ A NÍZKOMOLEKULOVÝCH TIOLOV

Marián Grman^{1,2}, Anton Mišák², Karol Ondriaš², Lenka Tomášová^{2,3}

¹Fakulta matematiky, fyziky a informatiky UK Bratislava, ²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, ³Farmaceutická fakulta UK Bratislava

Úvod: Sírovodík (H₂S) a oxid dusnatý (NO) sú plynné transmitters produkované endogénne v ľudskom organizme špecifickými enzýmami. Sú zahrnuté v regulácii mnohých (pato)fyziologických funkcií, napr. v kardiovaskulárnom systéme. Spriahnutie NO a H₂S signálnych dráh potvrdilo zistenie, že H₂S nepriamo zvýšil expresiu indukčnej NO syntázy a naopak, NO donor zvýšil expresiu a aktivitu cystationín beta syntázy (enzýmu produkujúceho H₂S) v bunkách hladkého svalstva aorty. Navyše, simultánne podanie NO a H₂S donora viedlo k úplne odlišnej odpovedi ako podanie samotného NO alebo H₂S donora. Interakcia NO s tiolovou skupinou nízkomolekulových tiolov alebo proteínov vedie k produkcii S-nitrózotiolov, spomedzi ktorých je najstabilnejší a zároveň aj najhojnejšie sa vyskytujúci S-nitrózoglutatión (GSNO). S-nitrózotiole fungujú v bunkách ako biorezervoár NO.

Materiál a metódy: Pomocou UV-Vis absorpčnej spektroskopie (Hewlett Packard 8452A Diode array spectrophotometer) sme študovali vplyv nízkomolekulových tiolov – redukovaného (GSH) a oxidovaného (GSSG) glutatiónu, cysteínu (Cys), N-acetyl L-cysteínu a metionínu (NAC) (všetky v koncentrácii 200 a 400 μmol/L), ďalej kyselina a pH (4.5-12.0) na kinetiku interakcie 200 μmol/L H₂S s 200 μmol/L GSNO, ktorá vedie k rozpadu GSNO. Konkrétne sme sa zamerali na kinetiku pri vlnových dĺžkach 270, 334 a 412 nm.

Výsledky a diskusia: Pri reakcii H₂S s GSNO postupne dochádzalo k uvoľneniu NO z GSNO (zánik absorpčného pásu pri 334 nm – väzba S-NO typická pre S-nitrózotiole), k narastaniu absorbancie pri 270 nm a k prechodnej tvorbe produktu s absorpčným maximom pri 412 nm. Rýchlosť interakcie bola najrýchlejšia pri fyziologickom pH 7.4, vyššie i nižšie pH reakciu spomaľovali. Nízkomolekulové tioly s voľnou tiolovou –SH skupinou (t.j. GSH, Cys a NAC) reakciu pri pH 7.4 a 8.0 inhibovali v poradí NAC>GSH>Cys, naopak, pri pH 6.0 reakciu urýchlili v presne opačnom poradí (Cys>GSH>NAC). GSSG a Met, t.j. zlúčeniny bez voľnej tiolovej skupiny, nemali na kinetiku reakcie žiadny vplyv. V pufrí s nízkou koncentráciou kyseliny (vzdušný kyslík sme z roztoku odstránili bublaním s najčistejším dusíkom) prebiehala reakcia pomalšie. Prítomnosť kyseliny urýchlila proces dekompozície

GSNO a mala za následok aj rýchlejší rozpad produktu s absorpčným maximom pri 412 nm, čo sa prejavilo na časovej sérii absorpčných spektier nejasným izosbestickým bodom.

Záver: Interakcia S-nitrózoglutatiónu so sírovodíkom vedie k uvoľneniu oxidu dusnatého z väzby s cysteínom S-nitrózoglutatiónu, pričom dochádza k tvorbe (medzi)produktov, ktoré môžu mať potenciálny biologický účinok. Sírovodík môže taktiež podobným mechanizmom zohrávať v organizme úlohu v procese denitrozylácie proteínov.

Práca bola podporená projektami APVV-0074-11 a UK/474/2013.

pH MODULÁCIA ŠÍRKY PÓRU MITOCHONDRIÁLNYCH CHLORIDOVÝCH KANÁLOV

Anton Mišák¹, Marián Grman^{1, 2}, Ľubica Máleková¹, Zuzana Tomášková¹, Karol Ondriaš¹

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, ² Oddelenie jadrovej fyziky a biofyziky UK

Úvod: Fluktuácia draslíkového prúdu tečúceho cez sarcK_{ATP} kanál, ktorá sprevádza kolaps mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) v podmienkach oxidačného stresu, naznačuje nepriamu účasť $\Delta\Psi_m$ -regulačných štruktúr v modulácii elektrického profilu srdcovej bunky. Jeden z mechanizmov, spojený s osciláciami v bioenergetickom stave mitochondrie, zahŕňa IMAC (Inner Membrane Anion Channel), ktorého zablokovanie viedlo k odvráteniu kolapsu $\Delta\Psi_m$ a k zastaveniu časového kolísania akčných potenciálov, čo poskytuje predpoklad cieleného využitia v prevencii srdcových arytmií. Prvotné štúdie pracujúce s analýzou rozptylu svetla na napučaných mitoplastoch popísali IMAC ako anión-selektívny kanál blokovaný kationmi Mg²⁺ a H⁺ a určili farmakologický profil. Zavedenie elektrofyziologických postupov do štúdie aniónovej transportnej aktivity vnútornej mitochondriálnej membrány prinieslo značnú variabilitu výsledkov, čo spolu s nejednoznačnosťou pri ich stotožňovaní s vlastnosťami kanálu IMAC, skoncentrovalo našu pozornosť v tejto práci do popísania selektivity a vodivostných vlastností mitochondriálnych chloridových kanálov v rôznych podmienkach, čím by sa rozšírilo identifikačné rozhranie pre porovnávanie vlastností na úrovni proteínu.

Materiál a metódy: Metodika práce pozostávala z dvoch hlavných častí: izolácia vezikúl vnútornej mitochondriálnej membrány a meranie elektrofyziologických vlastností chloridových kanálov pomocou rekonštitúcie kanálu v umelej lipidovej membráne (BLM). Separácia hrubej frakcie potkaních srdcových mitochondrií sa uskutočnila v niekoľkých krokoch diferenciálnou centrifugáciou. Po vystavení mitochondrií krátkodobému pôsobeniu trypsínu, za účelom rozpojenia membránových fragmentov sarkoplazmatického retikula, sa konečná frakcia mitochondrií vyčistila centrifugáciou v gradiente hustoty. Vezikuly sme získali rozbitím mitochondrií ultrazvukom. Meranie metódou BLM procedurálne obsahovalo utvorenie membrány zloženej zo zmesi lipidov DOPE a DOPC na rozhraní *cis* a *trans* roztoku a nanosenie vzorky obsahujúcej izolované vezikuly.

Výsledky a diskusia: Biofyzikálny popis mitochondriálnych chloridových kanálov zahŕňal dva základné atribúty - vodivosť a selektivitu pre rôzne typy aniónov. Vodivosť póru kanálu klesala v poradí aniónov Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ > chlorečnan ≈ mravčan >> octan, v prípade glukonátových aniónov sme nepozorovali tok prúdu v kontrolných podmienkach, čo nám

poskytlo predstavu o proporcionálnej limitácii veľkosti póru. Transport sledovaných aniónov cez vodivý pór vykazoval selektivitu v poradí $\text{Br}^- \geq \text{chlorečnan} \geq \text{I}^- \geq \text{Cl}^- \geq \text{mravčan} \approx \text{octan}$. Zmeraním závislosti nasýtenia vodivosti od koncentrácie Cl^- ($G_{\text{max}} = 316 \pm 15 \text{ pS}$ a $K_D = 499 \pm 67 \text{ mM}$) sme dostali univerzálnejšiu identifikačnú vlastnosť. Pre posúdenie regulačného účinku pH vo funkcii kanálu sme upravovali pH *cis/trans* roztoku a analyzovali modulovanie kinetických vlastností. Po znížení pH vodivosť vzrástla na oboch stranách membrány (*cis/trans*) a tento proces bol sprevádzaný znížením pravdepodobnosti otvorenia (P_o). Zvýšenie pH spôsobilo zníženie vodivosti, pričom nedošlo k zmene P_o . Interpretáciu výsledkov sme vzťahli na zmenu šírky póru chloridového kanálu, čo sme overovali účinkom pH na transport glukonátových aniónov. Experimenty ukázali prítomnosť a zvyšovanie vodivosti s klesajúcim pH.

Záver: Výsledky ukazujú niekoľko charakteristík podobných s kanálom IMAC, ale nami pozorovaná aktivácia iónmi Mg^{2+} nie je v súlade s pôvodne pozorovanou inhibíciou. Zmena vodivosti ako následok reakcie kanálu na zmenu pH v okolitom prostredí, by mohla odrážať konformačnú odpoveď póru v posunutých fyziologických podmienkach, s významom v transportnej regulácii aniónov.

Výskum bol podporený z projektov: APVV-0074-11 a VEGA/2/0094/12

Sekcia III

Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

MULTIDRUG REZISTENCIA PRI LIEČBE MYELO-DYSPLASTICKÉHO SYNDRÓMU

L. Messingerová¹, A. Jonášová², M. Barančík³, L. Suarez⁴, Z. Sulová¹, A. Breier¹

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava

² Hematologická ambulancia, I. Interná klinika, Všeobecná fakultná nemocnica Univerzita Karlova, Praha

³ Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava

⁴ Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, USA

Úvod: Myelodysplastický syndróm (MDS) je klonálna porucha pluripotentnej kmeňovej bunky charakterizovaná neefektívnou diferenciáciou hematopoetických progenitorových buniek, dyspláziou kostnej drene, genetickou instabilitou a vysokým rizikom transformácie do akútnej myeloidnej leukémie (AML). Vysoká heterogenita MDS si vyžaduje rozličné terapeutické prístupy medzi ktoré patrí transfúzia krvných elementov, podávanie hematopeických rastových faktorov (Eprex, Neorecormon, Aranesp), imunosupresívna terapia, imunomodulačná terapia (Lenalidomid), alogénna transplantácia kmeňových buniek, kombinovaná chemoterapia, hypometylačné látky a inhibítory histón deacetyláz (azacytidín, deoxyazacytidín). Epigenetické zmeny ovplyvňujú expresiu genetickej informácie bez zmeny samotnej sekvencie DNA. Medzi epigenetické liečivá používané pri liečbe MDS patria inhibítory metyltransferáz 5-azacytidín (5-aza) a decitabín (5-aza-2-deoxycytidín, DAC). miRNA sú evolučne dobre konzervované, malé, nekódujúce molekuly RNA približne 20-22 nukleotidov dlhé, ktorých expresia je ovplyvnená epigenetickými liečivami. miRNA sú dôležité regulátory expresie proteínov v bunkách a mnohých bunkových procesov vrátane diferenciácie, apoptózy a odpovede bunky na stress. Imunomodulačné liečivá (IMiDS) medzi ktoré patrí aj lenalidomid (LD) sú skupinou zlúčenín odvodených od prvého imunomodulačného liečiva- talidomidu. Závažným problémom pri liečbe onkologických pacientov je vznik rezistencie na túto liečbu. Multidrug rezistencia (MDR) je často spôsobená zvýšenou expresiou dvoch génov kódujúcich ABC transportéry a to: MDR 1, ktorý kóduje transmembránový P-glykoproteín (P-gp) a MRP1, ktorý kóduje “*multidrug resistance associated protein*” (MRP).

Materiál a metódy: Prvým cieľom našej štúdie bolo sledovať efekt terapie lenalidomidom u pacientov s MDS na expresiu P-gp, MRP a sledovanie hladín a aktivít LDH (laktát dehydrogenáza) a MMP. Vzorky periférnej krvi a kostnej drene od pacientov s MDS 5q- liečených lenalidomidom boli spracované separáciou leukocytov na Ficollu a expresie P-

gp a MRP boli stanovené pomocou RT-PCR. Aktivita MMP bola stanovovaná vo vzorkách plazmy pomocou želatínovej zymografie priamo v elektroforetickom gély. Hladiny MMP proteínov boli sledované pomocou Western blotu. Aktivita LDH bola stanovená ako oxidácia NADH na NAD za súčasnej redukcie pyruvátu na laktát spektrofotometricky podľa štandardného protokolu. Druhým cieľom našej štúdie bol skríning 8 miRNA na bunkových líniah HL60 a HL60R (rezistentná bunková línia HL60 na DAC). Bunky boli synchronizované v jednej fáze bunkového cyklu pomocou tymidínového dvojbloku a synchronizácia bola overená pomocou väzby propidium jodidu na DNA. Následne bola sledovaná expresia miRNA pomocou real-time PCR.

Výsledky a záver: Zistili sme, že liečba MDS pacientov lenalidomidom neindukovala zvýšenú expresiu P-gp a MRP mRNA. Pacienti s MDS mali signifikantne zvýšené aktivity LDH a MMP v krvnej plazme. Na druhej strane liečba lenalidomidom vyvolala signifikantnú redukciu MMP a LDH aktivít v plazme. Predlžovanie terapie s lenalidomidom vyvolalo stabilnú redukciu MMP a LDH aktivít rovnako ako aj redukciu hladín proteínov MMP v plazme pacientov. Doterajšie výsledky naznačujú, že liečba lenalidomidom u pacientov s myelodysplastickým syndrómom 5q- nespôsobuje zmeny v expresii P-gp a MRP. Taktiež sa zdá, že zmeny obsahu MMP a LDH v krvnej plazme monitorujú účinnosť liečby MDS pacientov lenalidomidom. Skríningom 8 miRNA (miRNA 329, miRNA 370, miRNA 432, miRNA 494, miRNA 665, miRNA 150, miRNA 1305, miRNA 583) na bunkových líniah HL60 a HL60R sme potvrdili rozdielnu expresiu miRNA 494 pri 24H, 48H a 72H inkubácii s DAC, pričom liečivo bolo bunkám podávané v 24H intervale pri koncentrácii 1 μ M. Z pozorovaných rozdielov expresie sa možno domnievať, že miRNA 494 je zapojená do rezistencie na DAC.

Táto práca bola podporená : Celgene, APVV-0084-07, VEGA (2/0123/10 and 2/0155/09).

OPAKOVANÝ STRES ZVYŠUJE PRODUKCIU ENDOGÉNNYCH KATECHOLAMÍNŮ V ADIPOCYTOCH MEZENTERICKÉHO TUKOVÉHO TKANIVA POTKANA

Peter Vargovič, Jozef Ukropec, Richard Kvetňanský

Ústav experimentálnej endokrinológie, SAV, Bratislava

Úvod: Katecholamíny (KAT) patria medzi dôležité neurotransmitery/ hormóny slúžiace predovšetkým ako skoré mediátory odpovede na stres. V nedávnej dobe bola taktiež objavená endogénna produkcia KAT v imunitných bunkách, ktoré ich využívajú ako vysoko účinné mediátory pri autokrinnej a parakrinnej signalizácii. V tejto práci sme sa zamerali na hľadanie aparátu syntézy endogénnych KAT v mezenterickom tukovom tkanive (MTT) potkana ako aj na vplyv pôsobenia psychologických, fyzikálnych a fyziologických stresorov na tento systém.

Materiál a metódy: Z potkanov kmeňa Sprague-Dowley bolo izolované mezenterické tukové tkanivo, ktoré bolo ďalej separované na adipocyty a stromálno-vaskulárnu frakciu. V oboch frakciách boli merané KAT, t.j. dopamín, noradrenalín a adrenalín (RIA, ELISA), génová expresia (kvantitatívna real time RT-PCR) a proteínové hladiny (Western blotting, imunohistochemia) enzýmov syntézy KAT, t.j. tyrozínhydroxylázy (TH) a fenyletanolamín-N-metyltransferázy (PNMT). Izolované adipocyty boli taktiež inkubované *ex vivo* v prítomnosti inhibítora syntézy KAT, alfa-metyl-p-tyrozínu (kompetitívny inhibítor TH) a bakteriálneho endotoxínu.

Vplyv stresorov na endogénnu produkciu KAT bol sledovaný pomocou vystavenia potkanov jednorázovému a opakovanému imobilizačnému stresu (IMO), akútnemu a chronickému chladovému stresu, subseptickej dávke endotoxínu (lipopolysacharid, LPS) a kombináciám týchto stresorov (IMO-chlad, IMO-LPS).

Výsledky a diskusia: MTT potkana obsahuje všetky tri KAT v sympatikových zakončeníach, adipocytoch a stromálno-vaskulárnych bunkách. V adipocytoch bol nájdený vlastný aparát syntézy endogénnych KAT schopný produkcie KAT *ex vivo* pričom len inkubácia v prítomnosti alfa-metyl-p-tyrozínu znížila koncentráciu intracelulárnych KAT. Opakovaná IMO zvyšuje syntézu KAT v adipocytoch kedy dochádza aj k postupnej akumulácii intracelulárneho adrenalínu. Akútny ako aj chronický chlad zvyšuje intracelulárne KAT v adipocytoch pričom následné vystavenie imobilizácii nemá vplyv na endogénne KAT, resp. skôr inhibuje ich syntézu. Vystavenie zápalovému stresu vplyvom i.p. podania LPS nemalo vplyv na syntézu KAT avšak pri predchádzajúcom vystavení opakovanej IMO

spôsobilo masívnu depléciu adrenalínu a nasledovné zvýšenie syntézy endogénnych KAT v adipocytoch.

Produkcia KAT bunkami tukového tkaniva poskytuje významné zdroje hlavne dopamínu a adrenalínu v tukovom tkanive, ktoré spolu s noradrenalínom uvoľňovaným sympatikovými nervami môžu mať významný vplyv pri regulácii fyziologických funkcií adipocytov, imunitných, nervových, endoteliálnych a ďalších buniek prítomných v MTT. Keďže počas vystavenia stresu dochádza k vysokému uvoľňovaniu noradrenalínu z nervových zakončení, má ďalšia tvorba dopamínu a adrenalínu samotnými bunkami pravdepodobne odlišný, alebo viac špecifický význam ako noradrenalín.

Záver: Uvedené výsledky ukazujú, že vplyvom opakovaného pôsobenia stresu dochádza k zvýšenej tvorbe KAT, ktoré nepochádzajú len zo sympatikových nervových zakončení, ale sú tvorené priamo v adipocytoch a ďalších bunkách mezenterického tukového tkaniva. Fyziologický význam tvorby endogénnych KAT v adipocytoch zatiaľ nieje objasnený, no pravdepodobne participujú pri regulácii metabolizmu a neuroimunoendokrínnej aktivity tukového tkaniva.

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0188/09, 2/0036/11, APVV-0148-06 a APVV-0088-10.

VPLYV PROTEAZOMÁLNEHO STRESU NA PREŽÍVANIE NEUROBLASTÓMOVÝCH A GLIOBLASTÓMOVÝCH BUNIEK

Ivana Pilchová, Katarína Kliková, Andrea Štefániková, Katarína Klačanová, Peter Račay

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod: Hromadenie nerozpustných polyubikvitinovaných zhlukov bielkovín je sprievodným javom ischemicko-reperfúzneho poškodenia neurálnych buniek. Vzniká v dôsledku súhry viacerých udalostí, ku ktorým patrí zlyhanie ubikvitín-proteazomálneho systému, oddisociovanie ribozomálnych podjednotiek či reverzibilné zastavenie translácie po ischémii. Súvislosť medzi agregáciou poškodených bielkovín v bunkách a iniciáciou apoptózy zatiaľ nebola objasnená, no považuje sa za jednu z možných príčin oneskorenej smrti neurálnych buniek po ischémii.

Materiál a metódy: Ľudské bunkové línie glioblastómu T98G a neuroblastómu SH-SY5Y (ATCC) boli kultivované pri štandardných kultivačných podmienkach. Následne boli ovplyvnené proteazomálnym inhibítorom bortezomibom (Velcade, PS-341) v koncentráciách 5,10,20,50 a 100 nmol/l po dobu 4,16,24, 48 a 72 hodín. Prežívanie buniek bolo hodnotené MTT testom. Z buniek inkubovaných 4 a 24h boli pripravené celobunkové lyzáty, následne boli vyizolované bielkoviny separované pomocou SDS-PAGE elektroforézy (12%) a vyhodnotené Western blot analýzou s použitím protilátok pre ubikvitín, Hsp70 a Hsp90 (Santa Cruz). Výsledky boli štatisticky spracované pomocou One-way ANOVA analýzy s použitím Tukey testu (OriginPro v8.5). Hladina signifikantnosti bola stanovená na $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia: K výraznému poklesu prežívania buniek T98G dochádzalo v koncentráciách bortezomibu vyšších ako 10 nmol/l a po viac ako 24-hodinovej inkubácii. Na neuroblastómových bunkách SH-SY5Y bol výrazný letálny efekt pozorovaný v obdobných časových intervaloch, ale v koncentráciách vyšších ako 20 nmol/l. Pomocou Western blot analýzy sme v bunkách T98G preukázali signifikantný nárast tvorby polyubikvitinovaných agregátov bielkovín a to už po 4-hodinovej inkubácii, ktorá, však, nie je spojená s poklesom viability buniek. K indukcii stresovej odpovede dochádzalo po 24h vo forme enormného nárastu hladiny Hsp70 a taktiež signifikantne zvýšenej hladiny Hsp90. Výsledky z glioblastómovej línie T98G boli následne porovnávané s výsledkami získanými s neuroblastómovou bunkovou líniou SH-SY5Y.

Záver: Naše výsledky preukazujú, že prítomnosť agregátov bielkovín nie spriahnutá s okamžitou iniciáciou bunkovej smrti, čo podporuje hypotézu, že agregáty bielkovín môžu byť príčinou oneskorenej smrti buniek po ischémii v mozgu. Avšak mechanizmus spájajúci hromadenie agregátov s iniciáciou procesov ústiacich do smrti buniek nie je stále jasný.

Práca bola podporená grantom APVV č. 0245-11.

SLEDOVANIE VÝSKYTU POLYMORFIZMOV VYBRANÝCH GÉNOV U PACIENTOV S MOZGOVÝMI NÁDORMI

Romana Richterová^{1,2}, Jana Jurečeková¹, Andrea Evinová¹, Branislav Kolarovszki², Martin Benčo², Július De Riggo², Juraj Šutovský², Silvia Mahmood¹, Peter Račay¹, Dušan Dobrota¹

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ²Neurochirurgické oddelenie UNM v Martine

Úvod: Nádory mozgu a jeho obalov tvoria histologicky heterogénnu skupinu nádorov s rozdielnymi vlastnosťami, spôsobom liečby a s rozličnou prognózou. V súvislosti s mozgovými nádormi je skúmaných množstvo génových zmien. Enzýmy rodiny glutatióntransferáz (GST) patria k detoxikačným enzýmom. Polymorfizmy génov pre tieto enzýmy sú spájané s vyšším rizikom vzniku mozgových nádorov a so zvýšenou chemorezistenciou nádorových buniek. Epidermálny rastový faktor (EGF) a inzulínu podobný rastový faktor (IGF) a ich polymorfizmy bývajú spájané s vyššou agresivitou nádorov a so skrátením prežívania pacientov. Gén TP53 patrí k najznámejším tumor-supresorovým génom. Poškodenie tohto génu je časté pri rôznych druhoch nádorov.

Materiál a metódy: Do štúdie sme zaradili 33 pacientov s mozgovými nádormi, ktorým bola odobratá venózna krv, ako aj vzorka tkaniva nádoru. Pomocou PCR-metódy sme vyšetrili prítomnosť polymorfizmov glutatióntransferáz, TP53, EGF a IGF-viažúceho proteínu 3 (IGFB3). Porovnali sme prítomnosť polymorfizmov v krvi aj v tkanive nádorov pacientov a v kontrolnej skupine.

Výsledky a diskusia: Zistili sme štatisticky významný rozdiel v distribúcii polymorfnej alely C TP53 génu v krvi a tkanive pacientov s nádormi mozgu. Taktiež bol zistený štatisticky významný rozdiel v distribúcii alely A a heterozygotného a polymorfného genotypu IGFB3 génu medzi kontrolnou skupinou a krvou pacientov s mozgovými nádormi. Pri iných génoch sme štatisticky významné rozdiely nezaznamenali.

Záver: Predbežné výsledky na malom súbore pacientov poukazujú na zvýšený výskyt polymorfizmu génu TP53 a polymorfizmu génu IGFB3 u pacientov s mozgovými nádormi. Pre relevantné zhodnotenie výsledkov je nevyhnutné realizovať vyšetrenia na väčšom súbore pacientov.

VPLYV GONADÁLNYCH STEROIDOV NA GÉNOVÚ EXPRESIU VYBRANÝCH CYTOKÍNOV V MAKROFÁGOCH KURY DOMÁCEJ

Zuzana Kaňková¹, Michal Zeman^{1,2}, Susanne Schwarz³, Bernd Kaspers³

¹ Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave ²Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika ³Inštitút fyziológie živočíchov, Veterinárna fakulta, Univerzita Ludwiga- Maximiliana v Mníchove

Úvod: Medzipohlavné rozdiely v aktivite imunitného systému majú veľký význam z hľadiska etiopatogenézy viacerých chorôb, ako aj z pohľadu evolučnej biológie, ale základné fyziologické mechanizmy podmieňujúce tieto rozdiely nie sú objasnené. Predpokladá sa pôsobenie pohlavných steroidných hormónov na rôzne tkanivá a bunky imunitného systému pričom dôkazy potvrdzujúce túto hypotézu stále chýbajú. Jednou z možností priameho ovplyvnenia imunitných štruktúr gonadálnymi steroidmi je ich vplyv na génovú expresiu cytokínov a chemokínov, ktoré predstavujú základné mediátorové informačné molekuly imunitných funkcií. Produkcia pohlavných steroidných hormónov sa zásadne mení počas ontogenézy jedincov, preto sme v prvej časti nášho pokusu hodnotili vplyv veku na génovú expresiu vybraných prozápalových cytokínov a chemokínov v primárnych kultúrach makrofágov pripravených z krvi a sleziny kury domácej. V druhej časti experimentov sme tieto výsledky doplnili štúdiom génovej exprese v *in vitro* podmienkach po priamom podaní vybraných steroidov.

Materiál a metódy: V pokusoch boli využité samce a samice M11 línie sliepok znáškového typu plemena Leghorn biely s haplotypom B2/2, chované v štandardných podmienkach na Ústave fyziológie živočíchov, Veterinárnej fakulty univerzity Ludwiga-Maximiliana v Mníchove. V prvom pokuse boli pomocou gradientovej centrifugácie, s využitím Ficollu, izolované makrofágy (M ϕ) zo sleziny a krvi zvierat troch vekových kategórií: mladé jedince (vek 7-11 týždňov; samce n = 3; samice n = 4), samice pred začiatkom znášky (vek 18-19 týždňov; n = 3), dospelé jedince (vek 28-29 týždňov; samce n = 3; samice n = 3). Vyizolované M ϕ boli po prilnutí na Petriho misku a premytí, stimulované 10 μ g/ml lipopolysacharidu (LPS) alebo kombináciou 10 μ g/ml LPS + interferón- γ (IFN γ ; 1:100). Po zozbieraní buniek do roztoku TRIzol® bola vyizolovaná mRNA, ktorá bola následne prepísaná do cDNA. Génová expresia prozápalových cytokínov (IL-1, IL-6, IL-18) a chemokínov (IL-8, K60, K203) bola kvantifikovaná pomocou real-time PCR (Applied Biosystems 7300 real-time PCR system). Druhá časť experimentov pozostávala z *in vitro*

ovplyvnenia stimulovaných M ϕ z krvi experimentálnych zvierat nasledovnými steroidnými hormónmi (dihydrotestosterón – DHT; testosterón propionát – TP; progesterón – P; estradiol benzoát – EB; kortikosterón – Cort). Postup izolácie M ϕ a stanovenia génovej expresie bol zhodný s prvou časťou experimentu.

Výsledky a diskusia: Génová expresia vybraných cytokínov a chemokínov sa významne nelíšila medzi pozorovanými vekovými skupinami samcov a samíc, ako aj medzi dvomi aplikovanými stimuláciami (LPS vs. LPS+IFN γ). Faktorom, ktorý štatisticky významne ovplyvnil expresiu sledovaných génov bolo tkanivo, z ktorého boli M ϕ izolované (krv vs. slezina) a to hlavne v prípade IL-1, IL-6 a K60. V druhej časti experimentu sme pozorovali dávково závislú moduláciu génovej expresie IL-6, K60 a K203, vyvolanú podaním steroidných hormónov. Zaznamenali sme očakávaný inhibičný účinok po aplikácii kortikosterónu, pričom efekty pohlavných steroidov sa líšili medzi opakovanými experimentmi naznačujúc kontext-dependentný účinok steroidov na expresiu cytokínov a chemokínov u vtákov.

Záver: Pokus s *in vitro* podaním hormónov preukázal potenciál steroidných hormónov ovplyvniť génovú expresiu vybraných cytokínov. Keďže dosiahnuté výsledky vykazujú výraznú variabilitu, predpokladáme, že účinok steroidov na aktivitu imunitného systému je komplexný a závisí od ontogenetického štádia a aktuálneho stavu organizmu. Tento kontext-dependentný účinok steroidov budeme analyzovať v ďalších experimentoch.

ÚLOHA NEUROTROFICKÝCH FAKTOROV PRI HYPER-SENZITIVITE NERVOV SPROSTREDKUJÚCICH BOLESTÍ Z VNÚTORNÝCH ORGÁNOV

Jozef Hatok^{1,2}, Peter Bánovčin ml.^{2,3}, Svetlana Grobarčíková^{2,5}, Alexander Sverstad^{2,4}, Juraj Halička^{2,4}, Dušan Dobrota¹, Marián Kollárik^{2,4}

¹Ústav lekárskej biochémie JLF Martin, ²Johns Hopkins School of Medicine - USA, ³Interná klinika Gastroenterologická JLF Martin, ⁴Ústav patologickej fyziológie JLF Martin, ⁵Urologická klinika JLF Martin

Úvod: Mechanizmy bolesti z pažeráka a pyrózy u pacientov, ktorí nereagujú na inhibíciou žlúdočnej kyseliny, sú len veľmi málo preskúmané. Jedným z kľúčových fenoménov zistených u týchto pacientov je hypersenzitivita na úrovni aferentných nervových dráh. Táto hypersenzitivita sa u pacientov prejavuje bolestivou odpoveďou na nízkoprahové podnety, ktoré nie sú bolestivé u zdravých jedincov. Podľa súčasných poznatkov sú neurotrofické faktory jediné známe molekuly produkované pri zápale, ktoré sú schopné navodiť dlhodobé zmeny v aferentných nervoch vrátane zmien v zmysle hypersenzitivity. Faktory sa väčšinou delia do troch skupín: neurotrofíny, odvodené od gliálnych buniek (GDNF) a neuropoetické cytokíny. Na základe našich predchádzajúcich výsledkov vieme, že pažerák je inervovaný tromi podtypmi nociceptorov: (a) spinálnymi, (b) vágovými jugulárnymi, ktoré sú vývojovo neurokrestálneho pôvodu, a (c) vágovými nodóznymi plakodálneho pôvodu.

Materiál a metódy: Naším cieľom bolo zistiť, ktoré podtypy nociceptorov inervujúcich sliznicu pažeráka, zistiť, aké receptory pre neurotrofické faktory exprimujú, a zistiť, či je expresia vybraných neurotrofických faktorov pre tieto receptory zvýšená v biotických vzorkách sliznice u pacientov s refluxnou ezofagitídou. Na vizualizáciu aferentných neurónov sme použili *in vivo* transfekciu s adeno-asociovaným vírusom produkujúcim green fluorescentný proteín (AAV-GFP) a na stanovenie expresie receptorov pre neurotrofické faktory sme použili single cell RT-PCR a retrográdne značenie u zvierat. Na stanovenie expresie neurotrofických faktorov v humánnych biopsiách sme použili kvantitatívnu PCR pomocou fluorescencia SybrGreen.

Výsledky a diskusia: Naše výsledky ukazujú, že: (a) sliznica pažeráka je inervovaná neurokrestálnymi ale nie plakodálnymi aferentnými nervami; (b) neurokrestálne nervy (80-90%) exprimujú GFR α 3 receptor pre neurotrofický factor artemin; (c) expresia mRNA pre

artemin je 5-násobne zvýšená v biopických vzorkách sliznice pažeráku u pacientov s refluxnou ezofagitídou.

Záver: Naše výsledky ukazujú, že neurotrofické faktory môžu zohrávať významnú úlohu v mechanizme navodenia ezofageálnej hypersenzitivity. Neurotrofický faktor artemin (člen rodiny GDNF), signalizovaný prostredníctvom tyrozín kinázového receptora GFR α 3, je jedným z adeptov schopných indukovať zmeny v patomechanizmoch neuropatickej viscerálnej bolesti. Komplexné pochopenie mechanizmov vzniku a perzistencie viscerálnej hypersenzitivity by otvorilo nové možnosti v manažmente a liečbe pacientov s terapeuticky náročnými funkčnými ochoreniami gastrointestinálneho traktu a iných orgánových systémov.

Táto práca bola podporená projektom "CEVYPET" spolufinancovaným zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

TGF- β 1 AKO KLÚČOVÝ REGULÁTOR MOLEKULÁRNYCH VLASTNOSTÍ CEREBELÁRNYCH GRANULÁRNYCH NEURÓNŮ V *IN VITRO* PODMIENKACH

Katarína Jašková¹, Michaela Pavlovičová¹, Michal Cagalinec², Lubica Lacinová¹, Dana Jurkovičová¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovenská republika

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

Úvod: Akútne poranenie centrálného nervového systému (CNS) je spúšťačom neurodegeneratívnych procesov, ktoré môžu vyústiť do vážneho poškodenia alebo straty funkcie neurónov. V mieste poranenia je exprimovaný transformačný rastový faktor β 1 (TGF- β 1), ktorý indukuje tvorbu fibrotickej jazvy, zabraňuje normálnemu synaptickému prenosu, plasticite a obnove poškodených neurónov. Patofyziológia poškodených neurónov je úzko spätá nielen s abnormálnou mitochondriálnou dynamikou, ale aj so zmenenou Ca^{2+} signalizáciou.

Materiál a metódy: Ako bunkový model slúžila primárna kultúra cerebelárnych granulárnych neurónov (CGN) izolovaná z 8-dňových potkanov rodu Wistar. CGN boli po šiestich dňoch *in vitro* vystavené účinkom TGF- β 1 (10 ng/ml), neselektívneho blokátora IP_3R 2-Aminoetoxydifenyl borátu (2APB, 10 μM) alebo účinkom špecifického blokátora TGF- β 1 receptora LY364947 (5 μM) na 48 hodín. Metódou RT-PCR sme stanovili hladiny mRNA vápnikových transportérov ($\text{IP}_3\text{R}1$, $\text{IP}_3\text{R}2$, RyR1, RyR2, SERCA2), metódou Western blot proteínové hladiny $\text{IP}_3\text{R}1$ a imunofluorescenčne sme $\text{IP}_3\text{R}1$ vizualizovali. Mitochondriálnu dynamiku (fúzia a delenie) spolu s mitochondriálnou morfológiou (dĺžka) sme stanovili po transfektovaní CGN s fotokonvertujúcim mito-KikumeGRI a analyzovali laserovým konfokálnym mikroskopom.

Výsledky a diskusia: CGNs po vystavení účinkom TGF- β 1 vykazovali zníženú expresiu vápnikových transportérov $\text{IP}_3\text{R}1$, $\text{IP}_3\text{R}2$, RyR1, RyR2 a SERCA2. Tieto zmeny vo vápnikovej signalizácii viedli tiež k zníženiu proteínových hladín $\text{IP}_3\text{R}1$, čím TGF- β 1 komplexne kontroluje vnútrobunkovú vápnikovú homeostázu. Blokátor TGF- β 1 receptora LY364947 vrátil mRNA hladiny všetkých pozorovaných vápnikových transportérov na kontrolnú úroveň. Prítomnosť 2APB signifikantne znížila génovú expresiu len $\text{IP}_3\text{R}1$ a $\text{IP}_3\text{R}2$. Fyziologickým následkom zmenenej expresie vápnikových transportérov bolo zníženie priemernej dĺžky neuritov v prítomnosti TGF- β 1 aj 2APB, čo potvrdzuje nepostrádateľnú

úlohu IP₃R1 v procese rastu axónu. TGF-β1 participoval aj na translokácii IP₃R1 do perinukleárneho priestoru. Uvoľňovanie Ca²⁺ z endoplazmatického retikula (ER) je spojené s jeho odčerpávaním do mitochondrií, čo následne zasahuje aj mitochondriálnu dynamiku. Expozícia TGF-β1 signifikantne znížila podiel mitochondriálnej fúzie, čo môžeme vysvetliť zníženou expresiou IP₃R1 a SERCA2 s následnou negatívnou reguláciou Mitofusinu 2 prítomného v ER aj mitochondrii. TGF-β1 znížil tiež priemernú dĺžku mitochondrií, nezmenil však počet mitochondriálnych kontaktov.

Záver: Po poranení CNS TGF-β1 spúšťa neurodegeneratívny progres, ktorý je sprostredkovaný zmenenou Ca²⁺ signalizáciou vnútri poranených neurónov. Našimi získanými výsledkami z CGN ovplyvnených TGF-β1 ako *in vitro* model poranenia CNS preto navrhujeme hypotézu, že neurodegeneratívne dôsledky po vystavení TGF-β1 sú aspoň čiastočne modulované cez IP₃-indukovanú Ca²⁺ signalizáciu.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0097/11 a Slovenskou agentúrou na podporu výskumu a vývoja kontraktom APVV-0212-10.

LIFESTYLE AND ALZHEIMER'S: HOW STRESS CAN SET YOUR BRAIN ON FIRE

Novák Petr

Institute of Neuroimmunology SAS, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava, Slovak republic

While neurofibrillary tau pathology is a driving force of Alzheimer's disease (AD), it triggers a multitude of downstream events, amongst them neuroinflammation.

This chronic inflammatory process is likely involved in mediating the widespread destruction of neuronal networks seen in AD. Moreover, the phenotype of the immune response to neurofibrillary pathology is a major determinant of the brain's ability to withstand this onslaught; this becomes especially evident in the oldest-old, where immunological health is the main predictor of cognitive function.

With Alzheimer's patients showing first signs of dementia at ages from their fifties in some and forty years later in others, and displaying varying rates of decline, the investigation of possible risk factors for the speed of this decline is warranted.

Psychological stress is sufficiently widespread to be a possible risk factor for a disorder as common as AD, and is under investigation as a factor in immunological disorders – for example multiple sclerosis.

We have subjected transgenic rats modeling human AD to brief or extended stress, and shown that this environmental factor is able to influence crucial inflammatory mediators – IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a, various chemotactic molecules and receptors involved in the inflammatory response. This evidence shows that psychological stress is able to influence the inflammatory process in AD in potentially detrimental ways, and thus play a role in the progression of this disorder.

VPLYV GLOBÁLNEJ ISCHÉMIE MOZGU NA PROTEÍNY BCL-2 RODINY OBSAHUJÚCE LEN BH3 DOMÉNU

Katarína Klačanová¹, Ivana Pilchová¹, Zuzana Tatarková¹, Mária Chomová², Mária Kovalská³, Andrea Štefaniková¹, Dušan Dobrota¹, Peter Račay¹

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin, ²Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK Bratislava, ³Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin

Úvod: Pro-apoptické proteíny Bcl-2 rodiny obsahujúce len BH3 doménu sú kľúčovými regulátormi mitochondriálnej apoptózy. Predpokladá sa, že v ischémii indukovanej neuronálnej smrti zohrávajú dôležitú úlohu hlavne dva proteíny z tejto skupiny, a to Bad a PUMA, ktorý je regulovaný na transkripčnej úrovni prostredníctvom p53. Pro-apoptická aktivita proteínu Bad je inhibovaná jeho fosforyláciou, Akt kinázou a proteín kinázou A. Je zaujímavé, že presným opakom je úloha fosforylácie v prípade proteínu Bik, ktorá je pre jeho úplnú pro-apoptickú aktivitu nevyhnutná.

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv globálnej ischémie mozgu na expresiu a vnútrobunkovú lokalizáciu pro-apoptických proteínov Bcl-2 rodiny obsahujúcich len BH3 doménu, Bad, Bik a PUMA.

Materiál a metódy: V experimentoch boli použité samce potkanov kmeňa Wistar (Dobrá voda, SR). Potkany boli vystavené 15 min globálnej mozgovej ischémii použitím modelu štvorcievnej oklúzie, po ktorej nasledovala reperfúzia v trvaní 1, 3, 24 a 72 hodín. Za účelom potvrdenia zapojenia Akt kinázy v mechanizme ischémii vyvolanej translokácie proteínu Bad do mitochondrií sme inkubovali bunky neuroblastómovej bunkovej línie SH-SY5Y s Akti1/2, inhibítorom kinázy Akt. Miera prežívania buniek bola následne stanovená na základe testu MTT. Mitochondrie boli izolované z buniek a hipokampov potkanov diferenciálnou centrifugáciou. Bielkoviny získané z bunkových lyzátov a z mitochondrií boli separované pomocou elektroforézy na tricínovom géli. Hladiny sledovaných bielkovín boli stanovené pomocou Western blotovej analýzy. Vnútrobunková lokalizácia proteínu Bik bola analyzovaná konfokálnym mikroskopom po imunofluoresenčnom farbení rezov mozgov kontrolných a experimentálnych zvierat.

Výsledky a diskusia: Zistili sme, že globálna ischémia mozgu neovplyvnila celkovú hladinu Bad a PUMA, avšak viedla k významnej akumulácii proteínov Bad a Bik v mitochondriách izolovaných z hipokampov potkanov, podrobených ischémii s nasledovnou reperfúziou v trvaní 1, 3, 24 a 72 hodín. V hladinách proteínu PUMA však neboli za rovnakých okolností pozorované významné zmeny. Keďže aktivita proteínu Bad je

regulovaná Akt kinázou, skúmali sme tiež dopad globálnej mozgovej ischémie na fosforyláciu Akt na Ser473, ktorý je považovaný za marker aktivácie Akt. Pozorovali sme významné zníženie proteínu p-Akt ihneď po ischémii ako aj zvýšenie p-Akt po ischémii nasledovanou reperfúziou v trvaní 3 hodín. Translokácia proteínu Bad do mitochondrií koreluje s inhibíciou Akt kinázy počas ischémie. Na druhej strane, je inkubácia SH-SY5Y buniek s Akt1/2 spojená s významným znížením ich relatívneho prežívania, avšak bez významnejších zmien mitochondriálnej hladiny proteínu Bad. Imunofluoresenčnými metódami sme detegovali kolokalizáciu proteínu Bik s markerom endoplazmatického retikula (ER), ktorá bola pozorovaná v pyramidových neurónoch CA1 vrstvy hipokampu kontrolných potkanov, pričom táto kolokalizácia nebola pozorovaná v tých istých bunkách potkanov podrobených ischémii nasledovanou reperfúziou v trvaní 3 hodín. Tento výsledok poukazuje na ischémiou indukovanú translokáciu bielkoviny Bik z ER do mitochondrií.

Záver: Naše experimenty poukázali na možné zapojenie proteínov Bad a Bik v procese ischémiou vyvolanej bunkovej smrti. Mechanizmus ich aktivácie po ischémii mozgu ako aj účasť oboch proteínov v procese oneskorenej bunkovej smrti však nie je úplne jasná.

Práca bola podporená APVV grantom č. 0245-11.

TAU PROTEIN AS A PREPETRATOR OF SYNAPTIC IMPAIRMENT

Santosh Jadhav, Norbert Zilka, Michal Novak

Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dubravska 9, 845 10 Bratislava

Introduction: Synaptic pathology is an early event and a better predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease (AD). Synaptic anomalies are observed both in early and late stages of AD, mainly in the hippocampus and cortical areas [1] and in tauopathies [2]. Interestingly, loss of select synaptic proteins well correlates with the cognitive decline in AD brains [1]. Studies have shown that higher tangle count was associated with abatement in synaptic proteins in AD [4]. Furthermore, tangle pathology better correlates with synaptic impairment in AD [5]. Protein truncation is an important pathological modification in human neurodegenerative diseases [6]. However, the mechanism as to how disease modified tau protein induces synaptic damage remains elusive.

Materials and methods: 14 months old transgenic rats expressing human truncated tau 151-391 with 3 repeat regions and corresponding controls were used. Synaptic fractionation was performed using sucrose gradient centrifugation. Purity of fractions was assessed using anti-synaptophysin (presynaptic marker) and anti-PSD95 (postsynaptic marker) antibodies. Analysis of synaptic proteins (synaptophysin, GAP43, PSD95, neuroligin), cytoskeletal markers (tubulin specific modifications, MAP2, neurofilaments, drebrin) was performed using immunoblotting. Analysis of amyloid pathway was performed by immunoblotting (APP) and ELISA (amyloid beta 40 and 42). Electron microscopy was performed to validate in-vitro results and synaptic vesicle counting.

Results and discussion: We have found that endogenous tau is increased in the presynaptic fraction (SMF) and is mislocalized to the postsynaptic density (PSD). Mislocalization of tau to the PSD was accompanied by phosphorylation of the microtubule binding domain (MTB) (pS262 and pS356), while in the SMF, pT205 and pS404 phosphorylation was enriched. We also observed the presence of highly stable microtubules only in the SMF. This may be due to the abundance of MTB non-phosphorylated tau specifically in the SMF. However, in the PSD, the neurofilament proteins were significantly decreased. Analysis of presynaptic proteins revealed a decrease in synaptophysin and an increase in bassoon protein. In postsynaptic density, decrease in drebrin E/A was observed. Electron microscopy confirmed the presence of stable microtubules and also showed decrease in synaptic vesicles in the terminals. Interestingly, no change in levels of APP and amyloid beta 42 were observed. However, amyloid beta 40 was decreased in the synaptic terminals of

transgenic animals suggesting that deregulation of amyloid beta pathway in the presence of pathogenic tau.

Conclusion: Misfolded protein tau elevates endogenous tau in synapses and induces its missorting to PSD, stabilizes microtubules, impairs vesicle transport independent of amyloid beta 42. Moreover, perturbation of amyloid beta pathway occurs downstream of misfolded truncated tau pathogenesis.

Acknowledgement: The work is supported by grants APVV-0200-11, APVV-0631-07 and APVV-0603-06.

Citovaná literatúra:

1. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001; 56(1):127-129.
2. Bigio EH, Vono MB, Satumtira S, Adamson J, Sontag E, Hynan LS, White CL 3rd, Baker M, Hutton M (2001) Cortical synapse loss in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:403-410.
3. Coleman PD, Kazee AM, Lapham L, Eskin T, Rogers K. Reduced GAP-43 message levels are associated with increased neurofibrillary tangle density in the frontal association cortex (area 9) in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1992 ;13(6):631-639.
4. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 2002; 4: 235–238.
5. **Jadhav S**, Zilka N, Novak M. Protein truncation as a common denominator of human neurodegenerative foldopathies. *Mol Neurobiol*. 2013 Mar 21.

DNA VAKCINÁCIA VOČI VÍRUSU CHRÍPKY TYPU A

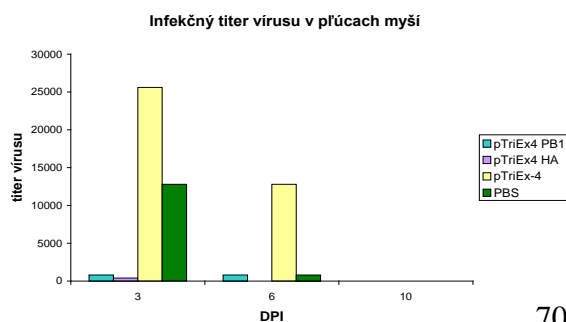
Margaréta Práznovská, Ivan Košík, Ingrid Krejnosová, Lucia Kotlárová, Gustáv Russ, František Kostolanský

Virologický ústav SAV, Bratislava

Úvod: Vírus chrípky typu A (IAV) spôsobuje pravidelne respiračné ochorenia u ľudí. Jedinou účinnou ochranou voči vírusu chrípky je očkovanie. Očkovanie sa musí opakovať každý rok kvôli antigénnym zmenám v povrchových glykoproteínoch hemaglutiníne (HA) a neuraminidáze (NA). V súčasnosti sa výskum zameriava aj na prípravu univerzálnej vakcíny, ktorá by bola účinná proti viacerým subtypom vírusu chrípky alebo efektívnejšej očkovacej látke. DNA vakcíny predstavujú jednu z možností ako dosiahnuť tento cieľ. Majú niekoľko výhod oproti bežne pripravovaným vakcínam, ako je rýchla produkcia bez použitia kuracích embryí, indukujú humorálnu i celulárnu imunitu a sú použiteľné na rôzne patogény. V našej práci sme sa zamerali na DNA vakcináciu plazmidom exprimujúcim vnútorný proteín IAV PB1 a jej účinkom voči infekcii vírusom chrípky A/PR/8/34.

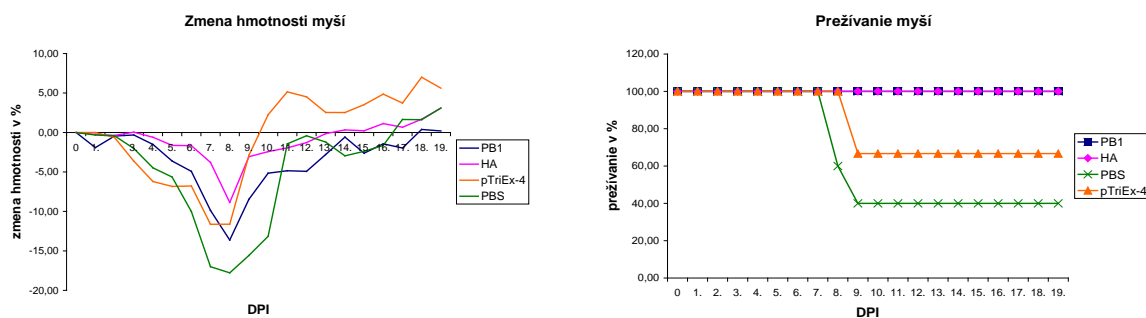
Materiál a metódy: Balb/c myši sme imunizovali tromi dávkami v prvej skupine plazmidom pPB1, v druhej plazmidom pHA (pozitívna kontrola-PK), v tretej plazmidom neobsahujúcim žiadny inzert (pTriEx-4) (negatívna kontrola-NK) a vo štvrtej PBS (NK). V každej dávke sme im podali 50 µg DNA na myš v 150 µl PBS v dvojtýždňových intervaloch. Po 3. dávke DNA vakcíny sme stanovili titer protilátok metódou ELISA, ako antigén sme použili purifikát vírusu A/PR/8/34 (PR8). Dva týždne po 3. dávke DNA vakcíny sme myši intranasálne infikovali vírusom PR8 1LD₅₀ (10³PFU). Na 3., 6. a 10. deň po infekcii (DPI) sme dve myši z každej skupiny usmrtili a odobrali im pľúca. Z homogenátu pľúc sme stanovili infekčný titer vírusu metódou RCA (rapid culture assay).

Výsledky a diskusia: Po 3. dávke DNA vakcíny u skupiny pHA a pPB1 sme stanovili titer protilátok, ktorý bol porovnateľný. U NK sa nevytvorili vírus špecifické protilátky. Infekčný titer vírusu u PK po 3.DPI bol 4x10². U skupiny pPB1 bola jeho hodnota 8x10², tento nízky infekčný titer naznačoval protektívny efekt. U NK bol infekčný titer vírusu mnohonásobne vyšší na 3.DPI 12x10³ - PBS a 25x10³ - pTriEx-4, pretože sa nevytvorili žiadne protilátky, ktoré by chránili myši pred infekciou.



Obr. 1: Infekčný titer vírusu v pľúcach myši imunizovaných DNA vakcínami a infikovaných vírusom PR8. Z každej skupiny boli 2 myšiam odobrané pľúca na 3., 6. a 10. DPI, infekčný titer vírusu bol stanovený pomocou RCA zo supernatantu homogenizovaných pľúc.

Po infekcii vírusom PR8 sme sledovali príznaky ochorenia, zmeny v hmotnosti myší a prežívanie. DNA vakcínou s plazmidom pPB1 sme dosiahli 100% prežívanie myší oproti NK. Okrem toho sme u myší imunizovanej pPB1 nepozorovali žiadne klinické prejavy infekcie, okrem miernej straty hmotnosti, ktorá sa po 14.DPI vrátila na svoju pôvodnú hodnotu.



Obr.2: Zmena hmotnosti myší a prežívanie myší imunizovaných DNA vakcínami a infikovaných vírusom PR8. Skupiny 9 myší boli sledované denne po 19. DPI

Záver: Indukovaná imunita voči PB1 proteínu zabránila klinickým prejavom infekcie a umožnila prežitie myší infikovaných vírusom A/PR/8/34. Mechanizmus protektívneho účinku DNA vakcíny obsahujúcej vnútorný proteín PB1 IAV nie je celkom jasný. Imunitné odpovede navodené prostredníctvom tohto proteínu môžu hrať významnú úlohu v obrane voči IAV.

Práca bola podporená grantami: APVV-0250-10, APVV-1605-06, DO7RP-0025-10, VEGA 2/0117/11, 2/0176/12, 2/0100/13.

MOLEKULÁRNA CYTOGENETIKA ARCHAICKÝCH A ODVODENÝCH SKUPÍN MOTOLÍC (TREMATODA)

Marta Bombarová¹, Marianna Reblánová², Marta Špakulová¹

¹Parazitologický ústav SAV Košice, ²Gendiagnostica Košice s.r.o.

Úvod: Motolice (Trematoda), jedna z parazitických tried ploskavcov (Platyhelminthes), zahŕňajú dve sesterské línie Aspidogastrea a Digenea. V prvej z nich je iba 80 druhov s viacerými archaickými znakmi stavby tela i vývinového cyklu, naopak digenetické motolice sú početnou skupinou s viac ako 18 tisícmi opísaných druhov vrátane významných ľudských cudzopasníkov (napríklad rody *Schistosoma*, *Fasciolopsis*, *Fasciola*, *Opisthorchis* atď.). Táto práca uvádza nepublikované údaje o karyotypoch a chromozomálnej lokalizácii klastrov ribozomálnych génov u parazita rýb *Aspidogaster limacoides* (Aspidogastrea) a štyroch druhov echinostómnych motolíc vtákov *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma myigawai*, *Hypoderaeum conoideum* a *Echinoparyphium aconiatum* (Digenea) a v kontexte s dostupnými informáciami o cytogenetike motolíc diskutuje hypotézu o evolúcii karyotypu v skupine.

Materiál a metódy: Chromozómové preparáty boli zhotovené zo živých dospelých alebo larválnych motolíc metódou teplej platne (Bombarová *et al.*, 2007) a farbené roztokom Giemsa alebo fluorescenčnou in situ hybridizáciou (FISH) so sondou 18S rDNA (Sahara *et al.*, 1999).

Výsledky a diskusia: Karyotyp *A. limacoides* z podtriedy Aspidogastrea sa skladá zo 6 párov pomerne dlhých chromozómov, z ktorých prvý a posledný sú dvojramenné a ostatné 4 jednoramenné ($2n = 12$, celková dĺžka haploidnej sady TCL = 35,54 μm). Klaster ribozomálnych génov (tj. organizátor jadierka, NOR) je lokalizovaný na apikálnom konci 3. páru chromozómov. Počet chromozómov u motolíc podtriedy Digenea bol vyšší, $2n = 22$ (*E. revolutum*, *E. myigawai*) alebo 20 (*H. conoideum*, *E. aconiatum*). Podobne ako v prípade archaického *A. limacoides*, jednoramenné (telocentrické a subtelocentrické) páry boli početnejšie ako páry dvojramenné (meta- a submetacentrické) a porovnateľná bola aj dĺžka sady chromozómov TCL, ktorá však medzidruhovo kolísala (TCL = 48,5; 31,0; 23,4; 28,1 μm , v poradí ako je uvedené vyššie). Oba druhy rodu *Echinostoma* mali jediný lokus pre ribozomálne gény situovaný na 3. najdlhšom páre a druh *H. conoideum* na 8. páre. Prekvapivo bol posledný druh *E. aconiatum* charakterizovaný dvomi lokusmi rDNA na pároch č. 3. a 8.

Záver: Napriek nedostatočne početným cytogenetickým analýzám v rámci triedy Trematoda je možné usudzovať, že ancestrálny počet chromozómov v archaickej skupine

Aspidogastrea je dvakrát nižší ($2n=10-14$ u 4 doteraz preskúmaných druhov) ako u skupiny Digenea ($2n = 20-22$ u väčšiny z cca 320 karyologicky opísaných druhov) a že zmena pravdepodobne nastala v dobe historickej diferenciácie týchto sesterských skupín. Významným faktom je relatívne vysoká miera konzervatívnosti karyotypu ilustrovaná stabilnou lokalizáciou ribozomálnych génov na pároch chromozómov č. 8 a najmä č. 3, ktorá sa vyskytuje u zástupcov oboch vývojových línií motolíc.

Práca bola financovaná projektom VEGA 2/0168/13 a LPP-0126-07 Agentúry na podporu výskumu a vývoja SR.

Citovaná literatúra:

Bombarová M, Marec F, Nguyen P, Špakulová M. (2007) Divergent location of ribosomal genes in chromosomes of fish thorny-headed worms, Pomphorhynchus laevis and Pomphorhynchus tereticollis (Acanthocephala). *Genetica* 131:141–149

Sahara, K., Marec, F., Traut, W. (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* 7: 449–460

CIRKULÁCIA A GENETICKÁ VARIABILITA ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM NA SLOVENSKU

Bronislava Víchová¹, Viktória Majláthová¹, Mária Nováková¹, Michal Stanko^{1,2}, Ivana Hviščová¹, Lucia Pangráčová¹, Tomáš Chrudimský³, Ján Čurlík⁴, Branislav Peťko¹

Parazitologický ústav SAV Košice¹, Ústav Zoológie SAV Košice², Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v.v.i.³, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach⁴

Úvod: *Anaplasma phagocytophilum* je obligátne intracelulárna gramnegatívna baktéria, patriaca do čeľade Anaplasmataceae. Humána granulocytárna anaplazmóza resp. kliešťová horúčka prežúvavcov, ochorenie, ktoré vyvoláva, má charakter prírodnej ohniskovosti. Pôvodca cirkuluje v prírodnom ohnisku prostredníctvom vektorov, ktorými sú kliešte z rodu *Ixodes* a kompetentných rezervoárových hostiteľov (hlodavce, prežúvavce). Analýza viacerých genetických markerov potvrdila existenciu výraznej vnútrodruhovej variability *A. phagocytophilum*. U jednotlivých kmeňov bola zistená rozdielna vektorová a hostiteľská preferencia, geografická distribúcia, patogenita, ako aj závažnosť klinických manifestácií a priebehu ochorenia. V Európe je epidemiológia a ekológia anaplazmózy odlišná od situácie v USA a prípady humánnej anaplazmózy sú zriedkavejšie. Naproti tomu sa *A. phagocytophilum* v Európe pomerne často vyskytuje v chovoch oviec, kôz a hovädzieho dobytku a predstavuje závažný veterinárny problém. Veľká variabilita kmeňov izolovaných z prežúvavcov a nejednoznačnosť asociácie k hostiteľom poukazuje na to, že gény, na základe ktorých je možné odlíšiť jednotlivé americké ekotypy, nie sú vhodné na detekciu vnútrodruhovej variability u európskych izolátov.

Materiál a metódy: Pomocou PCR amplifikácie fragmentov 16S rRNA a *groEL* génu kódujúceho tzv. heat shock operón a následnej sekvenačnej analýzy bola stanovená prevalencia a vnútrodruhová genetická variabilita *A. phagocytophilum* v kliešťoch *I. ricinus* z vegetácie, ako aj u rôznych skupín domácich a voľne žijúcich zvierat z viacerých lokalít na Slovensku.

Výsledky a diskusia: Prítomnosť baktérie bola potvrdená v kliešťoch *I. ricinus* na všetkých modelových lokalitách (1,4-5,5%), v krvi a tkanivách rôznych druhov voľne žijúcich prežúvavcov (diviak 16,7%; jeleň 17,5%; srnec 61,5%; daniel 66,6%; kamzík 3,5%) a hlodavcov (0,69%) a po prvý krát aj v tkanivách európskeho medveďa hnedého (24,3%). Porovnaním získaných *groEL* sekvencií sa potvrdila identickosť izolátov z kliešťov a rôznych druhov zvierat, ktoré sa však líšia od izolátov, získaných z hlodavcov. Výsledky

fylogenetickéj analýzy potvrdzujú, že slovenské/európske hlodavce sa s najväčšou pravdepodobnosťou nepodielajú na udržiavaní a cirkulácii *A. phagocytophilum* kmeňov s tak výrazným antropozoonóznym potenciálom, ako v prípade USA. Tieto zistenia korelujú aj s doteraz jediným potvrdeným prípadom humánnej granulocytárnej anaplazmózy na Slovensku.

Záver: Vnútrodruhovú genetickú variabilitu zohráva významnú úlohu v ekológii *A. phagocytophilum*, ktorá je oveľa zložitejšia ako sa pôvodne predpokladalo. Zistenie asociácii jednotlivých genotypov *A. phagocytophilum* s vektormi a rezervoárovými hosťiteľmi významným spôsobom prispieva k pochopeniu ekológie a objasneniu zákonitosti cirkulácie tohto patogéna v prírodnom ohnisku.

Práca bola finančne podporená projektmi: LPP 0341-06; APVV 0267-10; VEGA 2/0055/11.

KONŠTRUKCIA MUTANTNÝCH VÍRUSOV CHRÍPKY SO ZMENENOU FÚZOVACIOU AKTIVITOU METÓDOU REVERZNEJ GENETIKY

Lucia Kotlárová¹, Jaroslav Hollý¹, Margaréta Práznovská¹, Ervin Fodor² a Eva Varečková¹

¹Virologický ústav SAV, Bratislava, ²Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford

Úvod: V predkladanej práci sa zaoberáme prípravou vírusov so zmeneným pH optimom fúzie vírusovej a endozomálnej membrány, ktorá je esenciálnym krokom v replikácii vírusu chrípky. Na jej spustenie sú potrebné konformačné zmeny v hemaglutiníne (HA), ktoré sú indukované kyslým pH v endozóme. Navrhli sme niekoľko mutácií v HA, o ktorých predpokladáme, že spôsobia zmenu interakcie medzi subjednotkami v trimére HA s možným dopadom na zmenu fuzogénneho potenciálu a následne na ich patogenitu *in vitro* a *in vivo*.

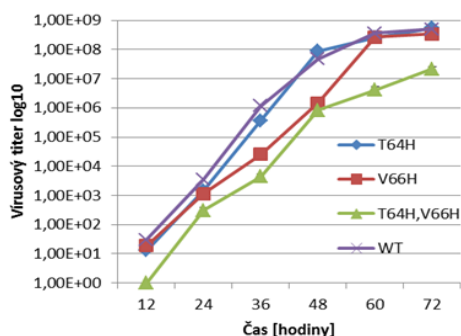
Materiál a metódy: Na 3D zobrazenie HA sme použili voľne dostupný program PyMOL. V HA exprimovanom expresnom plazmidom sme zaviedli a výmeny spôsobujúce zmenu v interakcii subjednotiek HA triméru.

Vírusy boli skonštruované transfekciou 8 plazmidmi pHW2000 – cDNA vírusu H1N1 A/WSN/33 a pomnožené na MDBK bunkách [1]. Pre potvrdenie mutácií vo víruse sme izolovanú RNA prepísali reverznou transkriptázou do cDNA, ktorú sme amplifikovali v PCR a mutácie potvrdili sekvenačne. Stanovili sme PFU vírusov [2], hemaglutinačný titer [3] a porovnali replikačnú aktivitu vírusov *in vitro* na MDBK bunkách počas 72 hodín od infekcie.

Výsledky a diskusia: Mutácie v plazmidoch boli navrhnuté v oblasti HA, ktorá je dôležitá pre spustenie konformačných zmien v HA trimére, potrebných pre aktiváciu fuzogénneho potenciálu HA. V pozícii aa64 a aa66 na ľahkom reťazci HA (HA2 gp) sme zaviedli výmenu T64H a V66H, jednotlivo aj ako dvojité mutácie. Predpokladali sme, že väzby medzi ľahkým a ťažkým reťazcom budú po zavedení histidínu potrebovať nižšie pH na rozvoľnenie väzieb a následné spustenie konformačných zmien, čo by malo viesť k príprave vírusu, ktorý nebude tak replikačne aktívny ako divý typ (wt). Zníženie pH optima fúzie by malo spôsobiť vyššiu stabilitu vírusu v kyslom pH, ktorá je pre vírus jedna z medzihostiteľských bariér [4, 5]. Vírusom sme stanovili PFU/ml a hemaglutinačný titer (Tab. 1) a porovnali sme ich rastové krivky (Graf 1). V prípade vírusu s dvojitou mutáciou sme

zaznamenali takmer o dva logaritmy nižšiu replikačnú aktivitu ako u wt, čo potvrdzuje predpoklad o úlohe histidínov v tejto oblasti.

Graf 1: Rastová krivka vírusov



Tab.1: Vzťah medzi PFU a HT vírusov

	PFU/ml/HU
WT	8.6 x 10 ⁵
T64 ₂ H	9.7 x 10 ⁵
V66 ₂ H	5.0 x 10 ⁵
T64 ₂ H, V66 ₂ H	5.3 x 10 ⁵

Záver: Podarilo sa nám pripraviť 3 mutantné vírusy, z ktorých mutant s dvojitou výmenou v HA2 gp (T64H, V66H) má zníženú replikačnú aktivitu *in vitro* v dôsledku zavedenia histidínov. Mutantný vírus pravdepodobne potrebuje nižšie pH alebo dlhší čas pre spustenie konformačných zmien, čo môže viesť k zníženej replikačnej aktivite. V ďalšej práci budeme kvalitatívne a kvantitatívne analyzovať rozdiely medzi pH optimom fúzie jednotlivých mutantov. Zmena pH optima fúzie spôsobená mutáciami v HA môže tiež v budúcnosti slúžiť ako marker patogenity novo sa objavujúcich nielen ľudských, ale i vtáčích vírusov chrípky typu A. Práca podporená grantom APVV-0250-2010 a VEGA2/0176/12

Literatúra:

- [1] Hoffman E. et al. (2000) PNAS, 97,11, p.6100-6113
- [2] Fislová T. et al. (2009) Arch. Virol. 154, p. 409-419
- [3] Varečková E. et al. (2006) Acta Virol. 50, p. 181-186
- [4] Imai MT. et al. (2012) Nature 486: 420-428
- [5] Herfst SEJ. et al. (2012) Science 336:1534-1541

VÝZNAM SUBSTITÚCIÍ K73,78,85R PB1F2 PROTEÍNU VÍRUSU CHRÍPKY TYPU A PRE JEHO BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI

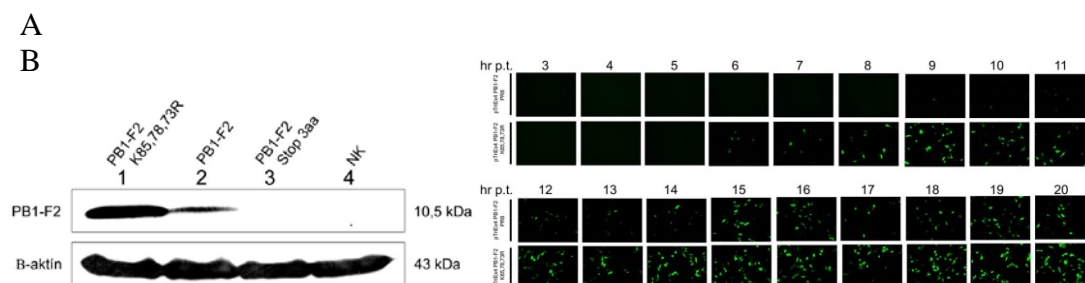
Ivan Košík, Margaréta Práznovská, Gustáv Russ

Virologický ústav SAV, Bratislava

Úvod: Vírus chrípky predstavuje významný respiračných patogén. Ročne infikuje milióny ľudí a než pol milióna ochoreniu podľahne. Negatívne prejavy infekcie na hostiteľský organizmus sa označujú ako patogenéza. Mimoriadne dôležité je identifikovať a predikovať vírusové faktory patogenity. Všeobecne Akceptovaným markerom patogenity je aj mimoriadne nestabilný neštruktúrny proteín PB1-F2. Spektrum vlastností tohto 10 kDa proteínu zahŕňa proinflamáciu, chemoatrakciu neutrofilov, potlačanie interferónovej dráhy, poškodzovanie mitochondriálneho membránového potenciálu, interakciu a vplyv na aktivitu vírusovej polymerázy. V práci sme sa zamerali na identifikáciu a sledovanie vplyvu stabilizácie PB1-F2 na jeho biologické vlastnosti.

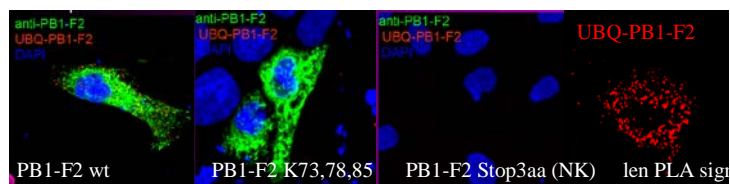
Materiál a metódy: Pomocou PCR sme zmutovali C terminálne lyzínové rezídua v pozíciách 73, 78 a 85 v ORF PB1-F2. Expresiu PB1-F2 sme sledovali westernblotom, konfokálnou mikroskopiou, ubiquitinylovanú formu PB1-F2 sme detegovali proximity ligation assay. Vplyvy mutácií na aktivitu vírusovej polymerázy sme sledovali GFP reportérovým

Výsledky a diskusia: Lyzínové reziduá predstavujú akceptorové miesta pre ubiquitináciu. Ubiquitinylovaný proteín je nasmerovaný do proteázomov na degradáciu. Nahradenie lyzínových rezíduí by malo tento proces obmedziť a viesť k zvýšeniu celkovej hladiny expresie PB1-F2. Na potvrdenie tejto hypotézy sme porovnali hladinu expresie wt ako i K73,78,85R variantu PB1-F2 vo westernblote , čo potvrdilo enormný vplyv mutácií na celkovú expresiu (Obr. 1A). Imunofluorescenčná analýza potvrdila zrýchlenú akumuláciu stabilizovanej formy PB1-F2 (Obr.1B).



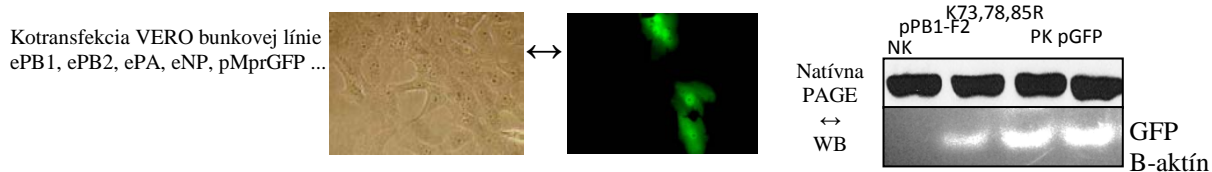
Obrázok 1.: Porovnanie hladiny expresie wt a K73,78,85R formy PB1-F2 (A) a expresná kinetika (B) PB1-F2 wt a K73,78,85R.

Aby sme sa presvedčili či je ubiquitinácia PB1-F2 zachovaná v stabilizovanej forme PB1-F2, využili sme proximity ligation assay ktorá umožnila sledovanie PB1-F2 špecifickej ubiquitinácie *in situ*. To potvrdilo kompletnú stratu ubiquitinylovej formy PB1-F2 v bunkách transfekovaných lyzínovým mutantom (Obr. 2).



Obrázok 2.: Fluorescenčná konfokálna kolokalizácia celkovej hladiny PB1-F2 (zelená farba) a jeho ubiquitinylovej formy (červené bodky) po transfekcii buniek MDCK wt a K73,78,85R formy PB1-F2.

Kotransfekciou stabilizovanej formy PB1-F2 s plazmidmi exprimujúcimi chrípkovú polymerázu a chrípkový RNA segment kodujúci GFP sa nám podarilo dokazať, že stabilizácia PB1-F2 má vplyv aj na aktivitu chrípkovej polymerázy (Obr. 3.)



Obrázok 3.: Analýza vplyvu rôznych foriem PB1-F2 na aktivitu chrípkovej polymerázy.

Záver: Zvýšená expresia PB1-F2 sa zdá byť kľúčová pre jeho funkcie.

Práca bola podporená grantami: APVV-0250-10, APVV-1605-06, DO7RP-0025-10, VEGA 2/0117/11, 2/0176/12, 2/0100/13.

CHARAKTERIZÁCIA ŠPECIFICITY C-TERMINÁLNYCH VÄZOBNÝCH DOMÉN BAKTERIOFÁGOVÝCH ENDOLYZÍNŮV

Lenka Tišáková¹, Veronika Jarábková², Andrej Godány^{1,2}

¹ Ústav molekulárnej biológie SAV Bratislava, ² Katedra biotechnológií FPV UCM Trnava

Úvod: Endolyzíny sú bakteriofágmi kódované peptidoglykánové hydrolázy, ktoré vykazujú lokálnu degradáciu hostiteľskej bunkovej steny, a to pri aplikácii zvnútra i zvonka. Endolyzíny z fágov infikujúcich Gram-pozitívne baktérie charakterizuje ich modulárna štruktúra - sú zložené aspoň z dvoch funkčne oddelených domén: N-terminálnej katalytickej a C-terminálnej väzobnej domény. Cieľom práce bolo navrhnutie univerzálnej väzobnej domény endolyzínu, aplikovateľného na viaceré kmene *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*, a to na základe *in silico* analýzy špecificity C-terminálnych väzobných domén vybraných bakteriofágových endolyzínov. Cieľové baktérie *S. aureus* a *S. agalactiae* patria medzi patogény, kontaminujúce potraviny, spôsobujúce závažné infekčné ochorenia. Eliminácia týchto patogénov z potravinových matric je v súčasnosti nevyhnutná pre zvýšenie potravinovej bezpečnosti.

Materiál a metódy: V programe ClustalW2 boli zrovnávané sekvencie SH3 väzobných domén endolyzínov zo stafylokokových bakteriofágov (P4W, MSA6, GH15, FI200W, A3R, phi812) a zo streptokokového bakteriofága B30. Potom boli identifikované konzervované aminokyseliny a ich korešpondujúce substitúcie. V programe BLAST na serveri NCBI boli získané grafické znázornenia s identifikáciou funkčných domén. V programe Lomets na serveri I-Tasser bola vytvorená predikcia sekundárnej štruktúry SH3 väzobnej domény z B30, na zistenie výskytu α -helixov resp. β -skladaných listov v štruktúre navrhovanej sekvencie. Za účelom klonovania a expisie sekvencie syntetického génu kódujúceho univerzálnu väzobnú doménu endolyzínu UBD (universal binding domain) v bunkách *Escherichia coli* sa pripravila jej restričná mapa pomocou programu NEBcutter.

Výsledky a diskusia: Základom pre navrhnutie sekvencie syntetického génu, predstavujúceho univerzálnu väzobnú doménu endolyzínu, boli vybrané sekvencie endolyzínov z polyvalentných stafylokokových fágov a zo streptokokového fága B30. Zrovnania sekvencií ich identifikovaných SH3 väzobných domén, vykazujú sedem konzervovaných aa: V10, P15, F24, A27, G30, W52, Y64; a 22 korešpondujúcich zvyškov, pričom dĺžka SH3/B30 je 48 aa a ostatných aa sekvencií endolyzínov je 67 (Obr.1). Navrhovaná nukleotidová sekvencia syntetického génu kódujúceho univerzálnu väzobnú

doménu endolyzínu (UBD), ktorá bude rozpoznávať bunkové povrchy *S. agalactiae* resp. *S. aureus* s dodatočne pridaným štart kodónom „ATG“ na začiatku sekvencie (bold):

ATGGTAGAGTCTAAGCCAAACGCAAGTAGCGCTGATAAAGAATTTATCAAGGCA
GGAACTCGTGTAAGAGTTTATGAAAAAGTGAATGGATGGTCACGCATTAACCATC
CAGAGTCGGCGCAATGGGTAGAAGATAACTAC

Záver: Na základe bioinformatických analýz špecificity C-terminálnych väzobných domén z vybraných bakteriofágových endolyzínov a podľa online predikcie sekundárnej štruktúry endolyzínu z B30 bola navrhnutá sekvencia syntetického génu kódujúceho univerzálnu väzobnú doménu UBD, optimálnu pre naväzovanie na bunkové steny kmeňov *S. aureus* a *S. agalactiae*.

HĽADANIE BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK V PÔDNOM METAGENÓME

Jana Nováková, Anita Izsáková, Tomáš Grivalský, Jana Godočíková, Marian Farkašovský

Ústav molekulárnej biológie SAV Bratislava

Úvod: Rezistencia baktérií na antibiotiká sa stáva v súčasnosti veľmi veľkým problémom. Na hľadanie nových, biologicky aktívnych látok, genomický prístup nestačí, pretože väčšina druhov, ktoré sa v prírode nachádzajú, je v laboratórnych podmienkach nekultivovateľná. Pred niekoľkými rokmi vznikol nový prístup – metagenomika – ktorý, na rozdiel od genomy, umožňuje izolovať a analyzovať celkovú genetickú informáciu obsiahnutú v konkrétnom habitate nezávisle od kultivácie [1]. Ako zdroj metagenómu slúžila v našom laboratóriu pôda, vzhľadom na skutočnosť, že patrí medzi najväčšie zásobárne mikroorganizmov produkujúcich sekundárne metabolity, ako sú polyketidy a neribozomálne peptidy [2].

Materiál a metódy: K izolácii environmentálnej DNA sme pristupovali dvoma spôsobmi, priamou a nepriamou metódou. Pri priamej metóde izolácie dochádzalo k lýze buniek v suspenzii s pôdnymi časticami, pri nepriamej izolácii lýze predchádzala frakčná centrifugácia, pri ktorej došlo k oddeleniu buniek od pôdných častíc a ich následnej imobilizácii v agarózových bločkoch. Linearizovaná environmentálna DNA bola ligovaná do pripraveného BAC vektora. Ligačné zmesi boli ďalej elektroporované do hostiteľských buniek *Escherichia coli* DH5 α . Na konštrukciu knižníc s veľkým inzertom bolo nevyhnutné optimalizovať protokol prípravy kompetentných buniek a elektroporácie. V metagenómových knižniciach sme hľadali biosyntetické gény pre polyketidsyntázy (PKS) a syntázy neribozomálnych peptidov (NRPS). Na analýzu klonov sme využili dva prístupy – skrining založený na sekvenčnej homológii a funkčný skrining. Na izoláciu individuálnych klonov sme použili zried'ovaciú metódu spolu s PCR metódou “touchdown” a kolóniovú hybridizáciu. Získané dáta sme analyzovali pomocou bioinformatických nástrojov.

Výsledky a diskusia: Použitím buniek *E. coli* DH5 α sme optimalizovali elektroporáciu veľkých fragmentov DNA (BAC) na $4,9 \times 10^8$ ktj/ μ g DNA [3]. Nepriamou metódou izolácie sme skonštruovali 3 metagenómové knižnice, z ktorých viac ako 50 % klonov nieslo inzerty s vysokomolekulárnou DNA. Pomocou priamej metódy izolácie DNA z pôdy sa nám podarilo navrhnúť postup izolácie veľkých fragmentov DNA (~100 kb). Analyzovali sme 53 klonov, z ktorých motívy ketoacylsyntáz nieslo 21 klonov. Rôzne

adenylačné domény neribozomálnych peptidsyntáz niesli 3 klony. Pomocou zavedenia zriedovacej metódy sa nám prostredníctvom PCR podarilo identifikovať časť klasteru kódujúceho zmesný sekundárny metabolit polyketid-neribozomálny peptid. Pre funkčný skrining sme vytvorili nového hostiteľa pre metagenómové knižnice. Kmeň *E. coli* sme modifikovali plazmidmi pFM720 a pFM799 a tak vytvorili kmeň FME7 schopný exprimovať metylmalonyl-CoA, tRNA a chaperóny, ktoré sú nevyhnutnou súčasťou syntézy sekundárnych metabolitov. Takisto sme pripravili modifikovaný kmeň *Pseudomonas putida* FMP4, v ktorom je integrovaný gén *trfA* z *E. coli* potrebný na replikáciu BAC vektora v tomto hostiteľovi.

Záver: Optimalizácia prípravy kompetentných buniek a samotnej elektroporácie, modifikácie izolačných postupov, použité skriningové metódy a príprava nových hostiteľských organizmov, povedú k zvýšeniu efektivity identifikácie sekundárnych metabolitov v metagenómových knižniciach izolovaných z pôdy.

Pod'akovanie: Práca bola financovaná z grantového projektu Humboldtovej nadácie pod číslom 3.3 DEU7/1152594.

Referencie:

- [1] Handelsman J, *et al.* (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**, R245-249.
- [2] Nováková J, Farkašovský M (2013) Bioprospecting microbial metagenome for natural products. *Biologia* **68** (5)
- [3] Nováková J, Izsáková A, Grivalský T, Ottmann Ch, Farkašovský M (2013) Improved method for high-efficiency electrotransformation of *Escherichia coli* with the large BAC plasmids. *Folia Microbiol* **4** (58).

GUÁNO NETOPIEROV AKO MOŽNÝ REZERVOÁR PATOGÉNNYCH MIKROORGANIZMOV

A. Vandžurová¹, P. Bačkor², P. Javorský¹, P. Pristaš^{1,2}

¹ Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, ² Univerzita Mateja Bela, Katedra biológie a ekológie, Banská Bystrica

Úvod: Netopiere (*Chiroptera*) sú nočné živočíchy so schopnosťou aktívneho letu. Počas dňa využívajú pestrú škálu úkrytov, ako napr. veže kostolov, podzemné dutiny, jaskyne, staré štôlne a podobne. Opakovaným využívaním týchto úkrytov sa na ich dne vytvára z výlučkov netopierov guáno. V súčasnosti je dostupných len veľmi málo informácií o variabilite baktérií spájaných či už netopiermi, alebo guánom. Nakoľko netopiere môžu slúžiť ako rezervoár, alebo prenášače viacerých zoonóz, cieľom štúdia bolo rozšíriť poznatky o mikroorganizmoch nachádzajúcich sa v guáne netopierov.

Materiál a metódy: V experimentoch sme analyzovali guáno letnej kolónie netopierov z veže kostola v Slovenskej Ľupči. Kultivovateľné mezofilné baktérie rastúce na neselektívnom kultivačnom médiu v aeróbných podmienkach pri 37°C sme identifikovali pomocou MALDI TOF analýzy proteínových profilov a klasickými mikrobiologickými technikami. Pre fylogenetickú analýzu sme u vybraných bakteriálnych izolátov sekvenovali gén pre 16S rRNA. Na testovanie biochemickej aktivity sme použili BIOLOG GEN III Micro Plate testovacie panely. Produkciu oxidázy, ureázy a indolu sme testovali použitím štandardizovaných kitov s použitím kultúr rastúcich na TSA platniach. Na detekciu virulentných faktorov sme použili testy na prítomnosť DNázy, koagulázy, haemolýzu a tvorbu kapsúl. Citlivosť vybraných bakteriálnych izolátov na antibiotiká sme testovali použitím diskovej difúznej metódy na Müller-Hinton agarových platniach.

Výsledky a diskusia: Tridsať náhodne vybraných izolátov z guána netopierov z veže kostola v Slovenskej Ľupči tvorili grampozitívne, koaguláza negatívne koky, ktoré sme pomocou MALDI TOF identifikovali prevažne (> 90%) ako izoláty *Staphylococcus nepalensis*. Druh *S. nepalensis* je relatívne nový druh tohto rodu pôvodne popísaný u kôz so zápalom pľúc z Himalájskeho regiónu [1]. Okrem pôvodného záchytu bol tento druh detegovaný len dva krát a to v ľudskom klinickom materiáli [2] a španielskej šunke [3]. Nezvyčajne nízka variabilita kultivovateľných mezofilných baktérií v študovanej vzorke guána je v rozpore s pozorovanou variabilitou baktérií v truse netopierov [4]. Vybrané bakteriálne izoláty sme klasifikovali na základe porovnania sekvencií génu pre 16S rRNA. Fylogenetická analýza ukázala, že všetky izoláty vykazujú najvyššiu podobnosť k sekvenciám

S. nepalensis a *S. cohnii*. Biochemická charakterizácia vybraných izolátov potvrdila ich podobnosť typovému kmeňu *S. nepalensis*. Na rozdiel od typového kmeňa testované izoláty vykazovali prítomnosť viacerých faktorov virulencie (tvorili kapsuly a vykazovali rezistenciu voči niektorým antibiotikám). V poslednom období stúpol záujem o štúdium netopierov a to hlavne kvôli tomu, že sú spájané s viacerými infekčnými ochoreniami. Zoznam patogénnych mikroorganizmov, ktoré môžu infikovať ľudí a iné domáce a voľne žijúce cicavce prenášaných netopiermi alebo ich guánom sa tak rozrástol o ďalší druh.

Záver: Zo získaných výsledkov vyplýva, že dominantné kultivovateľné mezofilné baktérie guána netopierov z veže kostola v Slovenskej Ľupči patria do okruhu *S. nepalensis*. Keďže tieto baktérie sú aj humánnymi patogénmi a exprimujú viaceré faktory virulencie, môže tak guáno nahromadené v blízkosti, alebo priamo v ľudských obydlíach a stavbách predstavovať významné zdravotné riziko.

Literatúra:

1. Spergser, J. *et al.*: *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. J. Syst. Evol. Microbiol, 53, 6, (2003);
2. Nováková, D. *et al.*: Occurrence of *Staphylococcus nepalensis* strains in different sources including human clinical material. FEMS Microbiol Lett, 263, 2, (2006);
3. Fulladosa, E. *et al.*: Volatile profile and microbiological characterization of hollow defect in dry-cured ham. Meat Sci, 86, 3, (2010);
4. Di Bella, C. *et al.*: Enteric microflora in Italian Chiroptera. J. Mt. Ecology, 7, pp. 221–224, (2003).

SKLÁDKY NEBEZPEČNÉHO ODPADU – ENVIRONMENTÁLNE RIZIKO ALEBO ZDROJ BIOTECHNOLOGICKY VYUŽITELNÝCH BAKTÉRIÍ ?

Zuzana Stramová^{1,2}, Anna Vandžurová¹, Jana Júdová³, Matej Remenár³, Peter Pristaš^{1,3}

¹Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, ²Katedra biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice, ³Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica

Úvod: Skládky nebezpečného odpadu predstavujú jednu z najväčších ekologických a environmentálnych záťaží. Na skládke hnedého kalu v Žiari nad Hronom, sa nachádzalo viac ako 10⁶ metrov kubických voľných a viazaných alkalických vôd. pH tejto vody bolo vyššie než 13 a nachádzalo sa v nej veľa ťažkých kovov (najmä chrómu – 50 mg/l). Napriek všetkému sa v tejto vode vyskytuje relatívne početná bakteriálna populácia [1]. Cieľom našej práce bola podrobnejšia charakterizácia izolátov získaných z tohto prostredia z hľadiska ich taxonomického zaradenia a produkcie priemyselne zaujímavých enzýmov.

Materiál a metódy: Jednotlivé izoláty sme identifikovali pomocou analýzy proteínových profilov prístrojom MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) a taxonomicky klasifikovali pomocou blastn analýzy 16S rRNA sekvencií voči databáze sekvencií typových kmeňov baktérií a archea. Vlastnosti vybraných izolátov, ako prítomnosť lipázy, amylázy, proteázy a celulázy sme stanovili klasickými biochemickými a mikrobiálnymi postupmi.

Výsledky a diskusia: Kolónie všetkých izolovaných kmeňov rástli na Živnom agare č. 2 pri pH 7 aj pH 11, teda majú alkalotolerantný charakter. Pomocou MALDI-TOF analýzy sme identifikovali len 4 z 12 izolátov (Tabuľka 1), pri identifikácii ostatných sme použili 16S rRNA analýzu. V bakteriálnej populácii drenážnej vody skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom dominujú Gram-pozitívne baktérie, najmä zo skupiny aktinobaktérii.

Tabuľka 1: Identifikácia izolátov z drenážnej vody skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom a prítomnosť vybraných enzýmových aktivít. ^a NRI - not reliable identification. ^b + označuje produkciu daného enzýmu.

Maldi skupina/počet izolátov	Maldi identifikácia druh/skóre ^a	16S rRNA identifikácia blastn best hit/ similarity (%)	Enzymová aktivita ^b			
			amyláza	celuláza	proteáza	lipáza
I/4	NRI	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> /99.7	-	+	+	+
II/1	NRI	<i>Microbacterium testaceum</i> 99.9	+	-	-	-
III/1	NRI	<i>Micrococcus lactis</i> / 100	+	-	+	+
IV/3	<i>Bacillus megaterium</i> 1.994	<i>Bacillus megaterium</i> / 99.7	-	+	-	+
V/1	<i>Micrococcus luteus</i> 2.244	<i>Micrococcus luteus</i> / 99.6	-	+	+	+
VI/2	NRI	<i>Brevundimonas bullata</i> / 99.6	-	+	-	-

Len 2 izoláty patria ku Gram-negatívnym baktériám rodu *Brevundimonas* a pravdepodobne sú predstaviteľmi nového, alkalotolerantného druhu tohto rodu. Viaceré izoláty exprimovali enzýmové aktivity degradujúce viaceré biopolyméry, najčastejšie sme pozorovali produkciu lipázy. U druhov *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Micrococcus lactis* a *M. luteus* ide o prvú detekciu lipázovej aktivity vôbec [2].

Záver: V bakteriálnej populácii drenážnej vody skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom dominujú alkalotolerantné Gram-pozitívne baktérie. U viacerých izolátov sme pozorovali produkciu amyláz, celuláz, proteáz a lipáz. Predpokladáme, že po overení ďalších vlastností by boli tieto mikroorganizmy prípadne nimi produkované enzýmy využiteľné v biotechnologických procesoch a aplikáciách. Skládky nebezpečného priemyselného odpadu môžu tak byť zdrojom unikátnych mikroorganizmov či nimi produkovaných enzýmov.

Literatúra:

- [1] Šťastný, P. (2005). Projekt revitalizácie dedičstva starej výroby hliníka. In Enviromagazín 1: 8 - 9
- [2] Pathma, J., Sakthivel, N. (2013). Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. In Applied Soil Ecology 70: 33–47.

IMOBILIZÁCIA ANAERÓBNÝCH MIKROORGANIZMOV

Igor Dolejš¹; M. Rebroš¹; M. Rosenberg¹; R. Stloukal²

¹Slovenská technická univerzita, Bratislava, ²LentiKats a.s., Praha

igor.dolejs@stuba.sk, martin.rebros@stuba.sk

Anaeróbne mikroorganizmy rodu *Clostridium*, ako sú *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutyricum* a *C. butyricum* sa podieľajú na produkcii niektorých priemyselne dôležitých látok akými sú napr.: acetón, butanol, etanol, 1,3 propándiol, vodík, kyselina maslová alebo kyselina octová. Táto produkcia tzv. biologickou cestou sa však stretáva s niekoľkými podstatnými negatívami, ako sú napr. nízka produktivita, nestabilita procesu a vysoký inhibičný vplyv produktov na metabolizmus mikroorganizmu. Zníženie dosahu týchto negatív alebo ich úplnú elimináciu je možné dosiahnuť pomocou imobilizácie mikroorganizmov vhodnou technikou. V prezentovaných experimentoch, boli zmienený zástupcovia rodu *Clostridium* úspešne imobilizovaní technológiou LentiKats[®], počas ktorej sa bunky ukotvia do nosiča šošovkovitého tvaru, tvoreného polyvinylalkoholovým gélom. Mikroorganizmy boli schopné prežiť tento vysoko stresujúci aerobný proces vďaka schopnosti tvoriť spóry. Po opätovnom vyklíčení spór, už pri anaeróbných podmienkach, bol sledovaný progres pri skrátení doby fermentácie, dosiahnutí vyšších výťažkov a dosiahnutí vyššej stability procesu. Systém fermentácie s takto imobilizovanými bunkami má vysoký potenciál byť použitý aj pri vysoko-objemových procesoch.

Pod'akovanie: Tento príspevok vznikol vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja: APVV-0656-11

Sekcia IV

Enzymológia a proteomika

ZMENY KINETICKÝCH VLASTNOSTÍ NA,K-ATPÁZY V MOZGOVEJ KÔRE POTKANOV OBOCH POHLAVÍ V AKÚTNEJ FÁZE OCHORENIA DIABETES MELLITUS TYPU 1.

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

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

Úvod: Predchádzajúce štúdie poukázali na zmeny iónového transportu v organizme počas diabetu. Medzi transportné systémy ovplyvnené diabetom patrí aj Na,K-ATPáza, ktorá má kľúčovú úlohu pri udržiavaní vnútrobunkovej koncentrácie sodíka a draslíka a v mozgu je súčasťou hematoencefalickej a hematolikorovej bariéry.

Materiál a metódy: V predloženej práci sme sa zamerali na charakterizáciu ATP- a Na-väzbových miest enzýmu 8 dní po vyvolaní diabetu mellitus typu 1 v mozgovej kôre potkanov oboch pohlaví kmeňa Wistar. Ochorenie sme indukovali u 15-týždňových potkanov jednorázovým intraperitoneálnym podaním streptozotocínu (STZ) v dávke $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Účinnosť podania STZ sme overovali stanovením hladiny glukózy v plazme. Kinetické vlastnosti Na,K-ATPázy v plazmalemálnej frakcii z mozgovej kôry sme študovali v in vitro podmienkach. Aktiváciu enzýmu substrátom sme sledovali v koncentračnom rozpätí $0,16 - 8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ATP a pre aktiváciu sodíkom sme použili koncentračné rozpätie $2 - 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Kinetické parametre sme vyhodnocovali metódou nelineárnej regresie. Pre štatistické vyhodnotenie výsledkov sme použili test ANOVA.

Výsledky a diskusia: Akútna forma diabetu mellitus typu 1 bola u samcov sprevádzaná zvýšenou aktivitou Na,K-ATPázy v prítomnosti nižších, fyziologicky dôležitých koncentrácií energetického substrátu ATP. Tieto zmeny boli však malé a nespôsobili zmenu kinetických parametrov K_m a V_{max} . Podobné výsledky sme pozorovali u samcov aj pri aktivácii enzýmu narastajúcimi koncentraciami sodíka. Pri vyhodnotení hodnoty K_{Na} na základe našich kinetických meraní sme však zistili, že STZ-indukovaný diabetes zapríčinil pokles tohoto parametra u diabetických samcov v mozgovej kôre potkana v porovnaní s kontrolnou skupinou, čo vypovedá o zlepšení väzbových vlastností enzýmu pre sodík v podmienkach akútneho 8 dňového diabetu.

U samíc akútneho diabetu mellitus spôsobil pokles aktivity Na,K-ATPázy pri všetkých nami sledovaných koncentráciách ATP, ale tento pokles bol relatívne malý a neodzrkadlil sa v zmene parametrov K_m ani V_{max} . Pri aktivácii enzýmu stúpajúcimi koncentraciami sodíka

sme opäť pozorovali malý pokles aktivity u diabetických samíc, ktorý sa prejavil vo forme síce štatisticky významného, ale iba 15%-ného poklesu hodnoty K_{Na} , čo vypovedá o zlepšení väzbových vlastností enzýmu pre sodík v podmienkach akútneho 8 dňového diabetu.

Záver: V podmienkach akútneho diabetu mellitus typu 1. sme zistili rôznorodú, pohlavne závislú adaptáciu enzýmu Na,K-ATPázy v kôre mozgu potkanov. Kým u samcov diabetes spôsobil mierne zvýšenie aktivity enzýmu, u samíc sme pozorovali mierny pokles aktivity enzýmu. Pohlavne závislý rozdiel sa prejavil najmä v zhoršenej schopnosti viazať ATP u samíc bez ohľadu na fyziologický stav, u kontrol aj u diabetických samíc, ako na to poukazuje zvýšenie hodnoty K_m v porovnaní so zodpovedajúcimi experimentálnymi skupinami samcov.

Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA: 2/0141/13.

PRÍPRAVA NANOŠTRUKTÚROVANÝCH POVRCHOV A ICH VYUŽITIE V MEDICÍNSKEJ DIAGNOSTIKE PROTEÍNOVÝCH MARKEROV

Tomáš Bertók^{1*}, Ján Tkáč¹

¹Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava 845 38, SR

* chemtobe@savba.sk

Úvod: V súvislosti s rozvojom poznania glykánových štruktúr a štúdia ich fyziologických a patofyziologických funkcií sa čoraz častejšie objavuje v odbornej literatúre termín glykoproteomika. Približne 70% všetkých eukaryotických proteínov je glykozylovaných, pričom glykány zohrávajú významnú úlohu pri komunikácii a adhezii buniek, pri vírusovej infekcii, dozrievaní erytrocytov, či nádorových a iných ochoreniach. Ich kombinatorický potenciál zároveň prevyšuje potenciál nukleových kyselín aj proteínov, pričom glykány ovplyvňujú nie len priestorovú štruktúru a funkciu biomolekúl ktorých sú súčasťou, ale aj ich chemické vlastnosti (napr. v prípade proteínov odolnosť voči proteázam). Táto práca je zameraná na vývoj nanoštruktúrovaných biosenzorov založených na stanovení glykoproteínov ako markerov rôznych ochorení.

Materiál a metódy: Pri príprave biosenzorov sa použilo niekoľko lektínov s rôznou špecificitou voči relevantným glykánovým štruktúram. Bol aplikovaný elektrochemický spôsob detekcie (prevažne s využitím elektrochemickej impedančnej spektroskopie), zároveň však ako referenčné a zobrazovacie metódy na ďalšiu charakterizáciu povrchu poslúžili aj cyklická voltametria, povrchová plazmónová rezonancia, QCM (quartz crystal microbalance), XPS (X-ray photoelectron spectroscopy), AFM (atomic force microscopy), skenovacia elektrónová mikroskopia a proteínová microarray. Vzorky boli pripravené rozpustením daného glykoproteínu vo vhodnom roztoku, jeho prídavkom do séra pacientov, prípadne vzorky predstavovali séra zdravých ľudí a ľudí s reumatoidnou artritídou.

Výsledky a diskusia: Využitím tzv. samousporiadaných monovrstiev tiolov na zlatom povrchu sa pripravili dva typy povrchov – 2-rozmerná (na planárnej Au elektróde) a 3-rozmerná konfigurácia (na medzivrstve zlatých nanočastíc) pre kovalentnú imobilizáciu lektínu, pričom sa dosiahli detekčné limity vo femto- až attomolárnych koncentráciách glykoproteínu vo vzorkách. Takto pripravené povrchy však vykazovali vysokú úroveň viazania nešpecifických molekúl. Ďalšie potlačenie nešpecifických interakcií sa uskutočnilo pomocou novosyntetizovaného zwitteriónového tiolu na báze kyseliny lipovej a sulfobetáinu. Vo vzorkách ľudských sér sa pomocou súboru troch lektínov merala odozva

na glykánové štruktúry prítomné na ľudských IgG protilátkach počas rôznych štádií ochorenia. Využitie práve elektrochemického detekčného konceptu (bez využitia značiek) je extrémne citlivý a pomerne lacný spôsob detekcie s jednoduchou miniaturizáciou výsledného senzora, čo ho robí využiteľným v medicínskej praxi.

Záver: V tejto práci sa podarilo jednoznačne preukázať význam glykánov pre medicínsku diagnostiku, ako aj význam lektínov ako biorozpoznávacích molekúl pre tento účel. Navyše sa podarilo navrhnúť povrch vysoko odolný voči nešpecifickým interakciám, ktoré predstavujú významný problém pri konštrukcii afinitných biosenzorov a podarilo sa jednoznačne odlíšiť séra chorých pacientov od sér zdravých ľudí. Tým sa vyvinula nová, ultracitlivá metóda pre spoľahlivú diagnostiku ochorení sprevádzaných zmenou glykozylácie proteínov v ľudskej krvi, prípadne iných komplexných vzorkách.

VÝVOJ A VYUŽITÍ MICROARRAY JAKO LEKTINOVÉHO BIOČIPU PRO CHARAKTERIZACI GLYKANOVÝCH STRUKTUR U KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Alena Šedivá¹, Olgica Nedić², Peter Gemeiner¹, Jaroslav Katrlík¹

¹*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Department of Glycobiotechnology, Dubravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia*

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

Úvod: Sacharidy hrají významnou roli ve všech formách života. Jsou zapojeny do většiny biologických jevů (buněčná interakce, buněčná smrt, transdukce signálu, zánětlivé procesy, rakovinové metastázy, bakteriální a virové infekce, atd.). Sacharidy také slouží jako zdroj energie, které jsou součástí koenzymů a části nukleových kyselin. Glykany a jejich konjugáty s proteiny a lipidy hrají klíčovou roli v imunitním a endokrinním systému, srážlivosti krvi, atd. Odstranění nebo změna cukerného řetězce může ovlivnit funkčnost glykoproteinu. To znamená, že proteinová glykosylace, vazba sacharidů s aminokyselinami bílkovin, má klíčovou roli v biologických funkcích a ovlivňuje tak celou řadu fyziologických procesů. Interakce mezi lektinem a glykanem jsou rozhodující pro různé biologické procesy (např. nativní lektiny účastní se zánětu). Sacharidy, jejich konjugáty s proteiny a lipidy a procesy s nimi spojenými se účastní mnoha fyziologických funkcí a hrají tak rozhodující roli v různých biologických událostech od buněčné komunikaci až k buněčné smrti. Proteinová glykosylace hraje významnou roli v řadě procesech jako je nádorové bujení, poruchy imunity, rakovina a mnoho dalších.

Materiál a metody: Lektinová a glykanová microarray se používá k charakterizaci sacharido-proteinových interakcí. Microarray je vysoce citlivá metoda, která umožňuje detekci glykoproteinu o nanomolárních koncentracích a z toho důvodu je vhodná pro glykoproteinové testování. Významnou výhodou této techniky je poměrně rychlé zpracování a vyhodnocení obrovského množství vzorků.

Během měření byly nastaveny různé laboratorní podmínky a byl sledován jejich vliv na výsledky. Vzorky byly nanášeny na epoxidové sklíčko za snížené laboratorní teploty a proměnlivé relativní vlhkosti vzduchu. Po nanesení vzorků následoval krok tzv. odpočinku, kdy nesmí dojít k žádné manipulaci s vzorky, aby došlo k správnému navázání vzorky na povrchu sklíčka. Po fázi odpočinku následuje krok fixace, kdy se celé sklíčko s vzorky ponoří do 1 M ethanolaminu. Následuje promytí sklíčka a nasazení speciální masky, která slouží

k nanešení lektinů. Po době navazování lektinu na příslušnou glykanovou strukturu, dochází k opětovnému promývání sklíčka a následným nanešením fluorescenčního barviva. Takto připravené sklíčko se vzorky se naskenuje a vyhodnotí zjištěné výsledky.

Výsledky a diskuze: V první fázi experimentů bylo optimalizováno měření na microarray, aby se v druhé fázi mohlo přistoupit k samotnému měření, kde se budou sledovat rozdíly mezi vzorkami séra a tkání u zdravých a nemocných pacientů s kolorektálním karcinomem.

Závěr: Cílem bylo navrhnout a připravit lektinový biočip pro sledování interakcí lektin-glykan. K tomuto účelu byla přednostně použita metoda microarray, která bude doplněna o další techniky jako povrchová plasmonová resonance, elektrochemické, western blot nebo ELLA.

Tato práce byla podpořena projekty APVV SK-SRB-0041-11 a COST CM 1101.

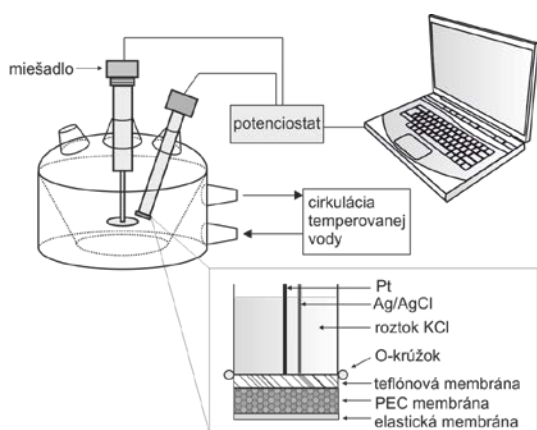
MIKROBIÁLNY BIOSENZOR NA MONITOROVANIE BAEYEROVEJ-VILLIGEROVEJ BIOOXIDÁCIE

Andrea Schenk Mayerová, Marek Bučko, Peter Gemeiner, Jaroslav Katrlík

Oddelenie glykobiotechnológie Chemický ústav SAV Bratislava

Úvod: Baeyerove-Villigerove (BV) oxidácie sa často uskutočňujú použitím *E. coli* s nadexprimovaným enzýmom zo skupiny BV monooxygenáz. Tie umožňujú selektívnu oxidáciu ketónov na estery alebo laktóny využívané vo farmaceutickom priemysle. Aj keď boli vyvinuté spektrofotometrické metódy na sledovanie aktivity BVMO, priebeh reakcie sa zvyčajne monitoruje plynovou chromatografiou. My sme sa rozhodli pripraviť biosenzor, ktorý je rozmerovo malý, umožňuje rýchle monitorovanie, ľahko sa pripravuje a je lacný.

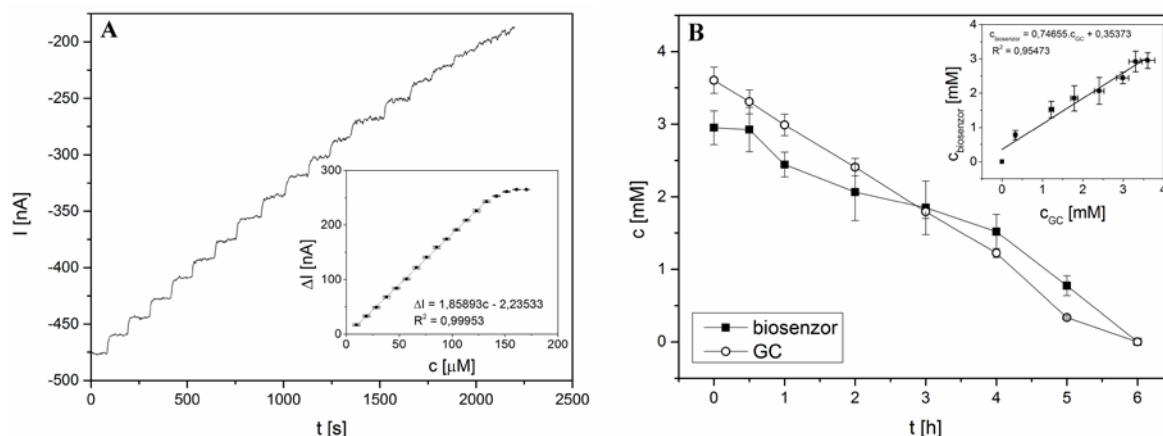
Materiál a metódy: Rekombinantné *E. coli* s nadexprimovanou cyklopentanón monooxygenázou (CPMO, EC 1.14.13.16) z *Comamonas sp.* NCIMB 9872 sa ako biorozpoznávací zložka imobilizovali do gélových membrán vzniknutých polyelektrolytovou komplexáciou alginátu sodného, sulfátu celulózy a poly(metylén-ko-guanidínu). Membrána sa prichytila na povrch miniaturizovanej kyslíkovej elektródy umožňujúcej veľmi rýchle merania s nízkym šumom (**Obr.1**). Merala sa odozva na (\pm)-cis-bicyklo[3.2.0]hept-2-én-6-ón (CBCH). Každé meranie sa uskutočnilo 3 krát a vypočítali sa smerodajné odchýlky nameraných hodnôt.



Obr.1 Schéma biosenzora.

Výsledky a diskusia: Biosenzor umožnil odčítanie signálu analytu do 30 s od jeho prídavku a pre CBCH bol lineárny rozsah kalibračnej krivky 8-130 μM a citlivosť 1,8 nA/ μM (**Graf.1A**). Nebola zaznamenaná odozva na žiadny z testovaných interferentov (ampicilín, glukóza, kyselina citrónová a octová, produkty reakcie). Počas jedného týždňa skladovania pri 4°C nebol pozorovaný pokles citlivosti biosenzora. Vyvinutý biosenzor bol použitý pri *off-*

line monitorovaní celého priebehu BV biooxidácie a výsledky boli porovnané s referenčnou analýzou plynovou chromatografiou (GC) (**Graf.1B**).



Graf.1A. Signál biosenzora ako funkcia koncentrácie CBCH s vloženou kalibračnou krivkou. **B.** Koncentrácia substrátu v reálnych vzorkách z biooxidácie meraná biosenzorom a GC s vloženou korelačnou závislosťou.

Záver: Bol vyvinutý prvý biosenzor na báze rekombinantnej *E. coli* s nadexprimovanou CPMO. Jeho analytické charakteristiky ako rýchlosť odpovede, lineárny rozsah, citlivosť, reprodukovateľnosť a stabilita spolu s úspešným meraním reálnych vzoriek ho predurčujú na monitorovanie BV biooxidácií.

Literatúra:

Schenk Mayerová A., Bučko M., Gemeiner P., Katrlík J.: Microbial monooxygenase amperometric biosensor for monitoring of Baeyer-Villiger biotransformation. *Biosensors and Bioelectronics* 50 (2013) 235-238.

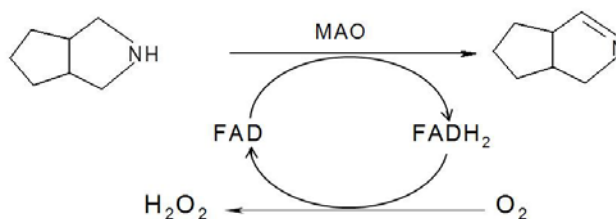
Pod'akovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0302-10 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a SAV VEGA (grant č. 1/0229/12). Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Aplikovaný výskum v oblasti priemyselnej biokatalýzy, kód ITMS: 26240220079, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

CELOBUNKOVÁ BOKATALÝZA S REKOMBINANTNOU MONOAMÍNOXIDÁZOU

Petra Zajkoska¹, Martin Rebroš¹, Michal Rosenberg¹, Nicholas J. Turner²

¹Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, ²Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester

Úvod: Monoaminoxidáza (MAO) je biokatalyzátor novej generácie, ktorý katalyzuje selektívnu biooxidáciu primárnych, sekundárnych i terciárnych amínov na príslušné imíny (modelový príklad Obr. 1), pričom v kombinácii s vhodným chemickým redukčným činidlom dochádza k produkcii chirálnych amínov z racemickej zmesi. V porovnaní s pôvodným enzýmom z *A. niger* má rekombinantný mutant MAO-N D5 exprimovaný v *E. coli* BL21(DE3) vyššiu substrátovú špecificitu a (*S*)-enantioselektivitu.



Obr. 1: Biotransformácia 3-azabicyklo[3,3,0]oktán HCl na imín katalyzovaná MAO

Produkty alebo intermediáty biokatalýzy pomocou MAO sa využívajú napr. pri výrobe čistých chemikálií, vo farmaceutickom a agrochemickom priemysle. Celobunková biokatalýza v kombinácii s imobilizačnými technikami vedie k vývoju recyklovateľných biokatalyzátorov, ktoré zlepšujú časovú a ekonomickú efektivitu procesu.

Materiál a metódy: Laboratórna produkcia *E. coli* BL21(DE3) exprimujúcej MAO-N D5 bola optimalizovaná z baničkovej úrovne na úroveň laboratórnych fermentorov s regulovaným miešaním, pH a DO režimom v LB médiu pri 30 °C počas 20 h fermentácie. Ďalším procesným krokom bola imobilizácia takto pripravenej biomasy pomocou LentiKats[®] technológiou na laboratórnej, ako aj priemyselnej úrovni. Aktivita celobunkového imobilizovaného biokatalyzátora bola testovaná pri opakovaných biotransformáciách a taktiež dlhodobo, pričom modelovým substrátom bol sekundárny amín 3-azabicyklo[3,3,0]oktán HCl. Priebeh biotransformácie bol monitorovaný pomocou GC-FID.

Výsledky a diskusia: Optimálnymi podmienkami na produkciu a expresiu MAO-N D5 v *E. coli* BL21(DE3) sú 10 % DO a pH 7. Po 20 h baničkovej kultivácii dosiahlo OD₆₀₀ hodnotu ~4,4 a počiatočná špecifická aktivita 123 mg_{produkt}/g_{DCW}. Pri regulovanej fermentácii bolo výsledné OD₆₀₀ ~8 pri nižšej počiatočnej špecifickej aktivite (97,6 mg_{produkt}/g_{DCW}), čo

viedlo k skráteniu času biotransformácie zo 7 na 4 hodiny pri použití biomasy z 50 ml fermentačného média. Po sérii optimalizačných krokov na laboratórnej úrovni bolo priemyselne imobilizovaných 15 g_{DCW} na liter polyvinylalkoholového gélu pomocou technológie LentiKats[®]. Priemyselné imobilizáty šošovkového tvaru vykazovali stabilnú aktivitu počas cyklu 6 biotransformácií. Počiatočnú aktivitu si zachovali aj počas testov dlhodobej skladovacej stability, keďže po 13 mesiacoch od imobilizácie došlo len k 3,6 % poklesu ich aktivity. Pri opakovaných biotransformáciách však aktivita klesala výraznejšie v porovnaní s čerstvo pripravenými imobilizátmi.

Záver: Optimalizáciou fermentačného procesu sa dosiahla efektívnejšia produkcia aktívnej biomasy exprimujúcej monoaminoxidázu. Jej aktivita bola potvrdená vo voľnej aj imobilizovanej forme. Celobunkový imobilizovaný biokatalyzátor je vhodný na opakované použitie pri biotransformácii amínov a taktiež na dlhodobé skladovanie.

***Pod'akovanie:** The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme BIONEXGEN under grant agreement n° 266025. This work was co-funded by the Slovak Research and Development Agency under contract No. DO7RP-0042-11.*

ĽUDSKÝ SRDCOVÝ RYANODÍNOVÝ RECEPTOR: ŠTRUKTÚRNE ŠTÚDIE N-TERMINÁLNEJ OBLASTI

Lubomír Borko^a, Vladena Bauerová-Hlinková^a, Július Košťan^b, Eva Hostinová^a, Juraj Gašperík^a, Vladimír Pevala^a, Lubica Urbániková^a, Alexandra Zahradníková^a a Jozef Ševčík^a

^a Ústav molekulárnej biológie, SAV, Bratislava, ^b Laboratóriá Maxa F. Perutza, Vienna, Austria

Ľudský ryanodínový receptor 2 (hRyR2) je iónový kanál sarkoplazmatickej membrány buniek myokardu [1, 2]. Jeho úlohou je transportovať Ca^{2+} ióny zo sarkoplazmatického retikula do cytoplazmy kardiomyocytov ako dôsledku elektrochemickej stimulácie v rámci tzv. excitačno-kontrakčnej mašinerie. Ľudský RyR2 je rozmerný homotetramér pozostávajúci z podjednotiek s molekulovou hmotnosťou ≈ 560 kDa [3]. N-terminálna (ak. $\approx 1-655$) a centrálna (ak. $\approx 2100-2500$) oblasť sú zapojené do regulácie vrátkovania kanála [4] a mutácie v týchto oblastiach sú spájané s niekoľkými srdcovými ochoreniami (napr. CPVT, ARVD2).[5]. Pre pochopenie mechanizmu vrátkovania a zlyhávania funkcie hRyR2 je dôležité poznať štruktúru kľúčových regulačných oblastí a v ideálnom prípade aj celého homotetraméru. Cieľom dolu uvedených projektov je priniesť nové poznatky o štruktúre vybraných oblastí hRyR2 v spojení s ich funkciou v rámci celej molekuly.

Môj príspevok prezentuje štruktúrne štúdie fragmentu hRyR2 1-606. Táto oblasť, niekedy označovaná ako tzv. mutačný „hotspot“, zahŕňa 23 substitučných a dve delečné mutácie (<http://www.fsm.it/cardmoc>) spojené s ochoreniami srdca, čo indikuje význam pre funkciu receptora. Štruktúra fragmentu hRyR2 1-606 bola určená röntgenovou kryštalografiou. Ako komplementárna metóda bola pre určenie tvaru molekuly z roztoku (štruktúry s nízkym rozlíšením) použitá metóda nízko-uhlového rozptylu röntgenového žiarenia (SAXS). Vzorky pre kryštalizáciu a SAXS boli pripravené izoláciou z lyzátu *E.coli* BL21 DE3 a purifikáciou afinitnou chromatografiou (IMAC) v kombinácii s gélovou filtráciou. Kvalita výsledných vzoriek bola testovaná pomocou SDS a natívnej PAGE, analýzy krivky topenia („thermal shift assay“, TMF) a dynamického rozptylu svetla (DLS). Úspešnou kryštalizáciou boli získané difraktujúce kryštály, z ktorých boli namerané difrakčné dáta z rozlíšením $2,4 \text{ \AA}$ [6]. Model hRyR2 1-606 bol vytvorený použitím balíka programov CCP4 a fázový problém bol riešený molekulárnou náhradou na základe homologickej kráľičej RyR1 štruktúry (PDB ID: 2XOA). SAXS model bol vytvorený pomocou programov balíka ATSAS 2,5.

Porovnanie štruktúry hRyR2 1-606 s dostupnými štruktúrami príbuzných molekúl (králičí RyR1, PDB ID: 2XOA a inozitol 1,4,5-trifosfátový receptor, PDB ID: 3UJ0) potvrdilo konzervovanosť troch prítomných domén, ako aj oblastí s potenciálnym regulačným významom. SAXS model hRyR2 1-606 obsahoval oblasti chýbajúce v modeli získanom röntgenovou kryštalografiou, čím komplementoval dosiahnuté výsledky.

Štruktúrny model hRyR2 1-606 je prvou štruktúrou ľudského RyR2 v rozsahu 600 aminokyselín, čím poskytuje priestor pre ďalšie štruktúrne analýzy spojené s analýzou mutácii a štúdiom regulácie priamo na modeli štruktúry ľudského proteínu.

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantmi Slovenskej grantovej agentúry VEGA 2/0131/10 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-0628-10.

1. Meissner, G. (2002). Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci* 7, d2072-2080.
2. Meissner, G. (2004). Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* 35, 621-628.
3. Otsu, K., Willard, H.F., Khanna, V.K., Zorzato, F., Green, N.M., and MacLennan, D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265, 13472-13483.
4. Ikemoto, N., and Yamamoto, T. (2002). Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci* 7, d671-683.
5. Yano, M., Yamamoto, T., Ikeda, Y., and Matsuzaki, M. (2006). Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3, 43-52.
6. Borko, L., Kostan, J., Pevala, V., Gasperik, J., Hostinova, E., Urbanikova, L., Zahradnikova, A., Carugo, K.D., Hlinkova, V.B., and Sevcik, J. (2013). Human Cardiac Ryanodine Receptor: Preparation, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the N-Terminal Region. *Protein and peptide letters*.

POSTEROVÁ SEKČIA

PROBLEMATIKA VÝSKYTU BAKTÉRIÍ REZISTENTNÝCH VOČI ANTIBIOTIKÁM V KALOCH A ODPADOVÝCH VODÁCH NA SLOVENSKU

L. Birošová¹, T. Mackuľák², I. Bodík²

¹*Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT, STU Bratislava,* ²*Oddelenie environmentálneho inžinierstva, Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva, FCHPT, STU Bratislava*

Úvod: Od objavu antibiotík začalo neúmerne narastať nielen ich používanie v klinickej humánnej, či veterinárnej praxi, ale aj ich diseminácia do prostredia. Rovnako aj používanie dezinfekčných a biocídnych látok sa rozšírilo z nemocničných zariadení do domácností. Antibiotiká a biocídy sa dostávajú ďalej do odpadových vôd, do čistiarní odpadových vôd (ČOV), kde mnohé z nich nestihnú byť biodegradované a môžu sa šíriť do biosféry. Subinhibičné koncentrácie týchto látok v ČOV navyše do značnej miery ovplyvňujú rezistenciu baktérií kalu, ktorý sa následným spracovaním tiež dostáva do biosféry a tým prispieva k šíreniu determinantov rezistencie voči antibiotikám. Naším cieľom bolo stanoviť výskyt koliformov a enterokokov odolných voči antibiotikám v kaloch a odpadových vodách z ČOV na Slovensku.

Materiál a metódy: Vzorky stabilizovaného kalu a odpadovej vody pritekajúcej na ČOV boli v sterilnej skúmavke transportované do laboratória a následne nariadené v BHI médiu. Vzorky boli kultivované na selektívnych diagnostických médiách s bez antibiotika. Po inkubácii sa zhodnotil počet kolóniotvorných jednotiek a vyjadrilo sa percento rezistentných kmeňov.

Výsledky a diskusia: Rezistentné baktérie boli stanovované vo vzorkách stabilizovaného kalu z troch mestských ČOV na Slovensku v dvoch ročných obdobiach (zima a leto). Počet koliformov sa pohyboval od 70 – 80% a enterokov 30-50% z celkového počtu aeróbov. Čo sa týka rezistencie voči antibiotikám, tú sme zaznamenali iba v prípade koliformných baktérií. Prevažná väčšina týchto baktérií v stabilizovanom kale bola rezistentná najmä voči ampicilínu, v niektorých prípadoch to bolo až 98% koliformov. V prítokovej vode sme tiež zachytili približne polovicu ampicilín rezistentných kmeňov, čo môže byť aj dôsledok prítomnosti odpadovej vody z nemocníc. Rezistenciu sme však zachytili aj voči gentamicínu a ciprofloxacínu u viac ako polovice kmeňov, čo nie je prekvapujúce nakoľko v zimnom období boli v odpadových vodách stanovené vysoké

koncentrácie práve ciprofloxacínu. Tieto subinhibičné koncentrácie antibiotík do značnej miery môžu ovplyvniť vznik rezistencie spolu s mobilnými genetickými determinantami nesúcimi gény rezistencie, ktoré sa do ČOV dostávajú v odpadovej vode.

Záver: Nadmerné užívanie antibiotík má za následok ich zvýšenú koncentráciu v odpadových vodách a zároveň aj v ČOV kde môžu ovplyvniť odolnosť baktérií aktivovaného kalu voči antibiotikám. Nakoľko čistiarenský kal sa na Slovensku podľa nariadenia vlády aplikuje najmä do pôdy, prispieva sa takýmto spracovaním k diseminácii nielen antibiotík ale najmä génov rezistencie do prostredia.

Pod'akovanie: Práca vznikla za finančnej podpory Agentúry pre podporu vedy a výskumu APVV-0122-12

ZVÝŠENÁ CYTOTOXICITA MITOXANTRONU NAVODENÁ VPLYVOM PROADIFENU V BUNKÁCH ĽUDSKEJ PROMYELOCYTOVEJ LEUKÉMIE

Lucia Hil'ovská, Rastislav Jendželovský, Zuzana Jendželovská, Jaromír Mikeš, Peter Fedoročko

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Úvod: Častou komplikáciou chemoterapeutickej liečby je znižujúca sa senzitivita nádorových buniek voči aplikovanému liečivu, čo napokon vedie ku vzniku mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR). Významným mechanizmom zodpovedným za MDR je zníženie intracelulárnej koncentrácie liečiva až na neúčinnú hladinu prostredníctvom membránových transportných proteínov (ABC transportéry). Látky schopné inhibície ABC transportérov by mohli zlepšiť účinnosť terapie. Nesteroidné antiflogistiká sú využívané ako analgetiká, antipyretiká a látky s protizápalovým účinkom. Okrem toho sú schopné aj chemosenzitizácie nádorových buniek v dôsledku ovplyvnenia aktivity ABC transportérov, čo napokon vedie k posilneniu cytotoxického účinku chemoterapeutík. Cieľom tejto práce bolo analyzovať vplyv kombinovaného účinku NSAIDs (proadifen) na výslednú cytotoxicitu chemoterapeutika (mitoxantron – MTX) v bunkách ľudskej promyelocytovej leukémie.

Materiál a metódy: Ako experimentálny model boli použité bunkové línie ľudskej promyelocytovej leukémie (HL-60 – citlivá voči MTX a cBCRP subklon – rezistentná voči MTX). Účinok proadifenu na výslednú cytotoxicitu chemoterapeutika bol stanovený na základe zmien metabolickej aktivity buniek (MTT test), kombinačného indexu a zmien mitochondriálneho membránového potenciálu – MMP, externalizácie fosfatidylserínu a bunkového cyklu (analyzované pomocou prietokového cytometra – BD FACSCalibur).

Výsledky a diskusia: Ovplyvnenie efektivity chemoterapie prostredníctvom proadifenu je málo preskúmané. Výsledky dosiahnuté v našich laboratóriách poukazujú na nesteroidné antiflogistikum, proadifen, ako na ďalšiu látku schopnú inhibovať aktivitu ABC transportérov. Predinkubácia buniek s proadifenom (24 hod) zvýšila cytotoxicitu mitoxantronu v prípade oboch bunkových línií, avšak výraznejšie zmeny sme pozorovali pri bunkách rezistentných. Pomocou programu CalcuSyn a na základe kombinačného indexu sme zistili, že proadifen má v prípade buniek HL-60 aditívny až synergický účinok, pričom v prípade cBCRP subklonu je účinok výlučne synergický. V prípade analýz uskutočnených prietokovou cytometriou (zmeny MMP, externalizácie fosfatidylserínu a zmeny bunkového

cyklu) sme signifikantné zmeny v dôsledku kombinovanej terapie pozorovali najmä pri rezistentných bunkách. Na základe týchto poznatkov je možné predpokladať, že proadifen by mohol byť schopný potlačiť rezistenciu nádorových buniek a zvýšiť účinnosť vybraného chemoterapeutika, mitoxantrou.

Záver: Táto práca poukazuje na proadifen, ako na nesteroidné antiflogistikum schopné modulovať výslednú cytotoxicitu použitého chemoterapeutika v *in vitro* podmienkach. Na základe týchto výsledkov je možné predpokladať, že proadifen zvyšuje cytotoxicitu mitoxantrou, avšak na odhalenie presného mechanizmu budú potrebné ďalšie analýzy.

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0626/11 a Nadáciou Výskum rakoviny č. O-12-102/0001-00.

BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCIA PRÍRODNÝCH ARÓM S VYUŽITÍM ENKAPSULOVANÝCH BIOKATALYZÁTOROV

Anikó Illéssová^{1*}, Marek Bučko¹, Alica Vikartovská¹, Peter Gemeiner¹

¹Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava 845 38, SR

*chemilan@savba.sk

Úvod: Chuťové a vonné látky boli vždy predmetom záujmu a uplatnenie si našli v rôznych odvetviach priemyslu. V súčasnosti prevláda trend produkcie týchto aróm pomocou biotechnológie, ktorá spočíva v zapojení mikroorganizmov do výrobného procesu. Takto získané produkty majú prírodný charakter a na svetovom trhu aróm sú vyhľadávanejšie ako ich chemicky syntetizované ekvivalenty. Baktéria *Gluconobacter oxydans* je gram-negatívna aeróbna baktéria z rodu *Acetobacteraceae*. Prirodzene sa vyskytuje na miestach bohatých na cukor, napr. na ovocí. V priemysle sa využíva kvôli svojej neúplnej oxidácii alkoholov na príslušné karboxylové kyseliny. Metabolizmus baktérie sme v tejto práci využili na produkciu kyseliny fenyloctovej, ktorá je zložkou medovej arómy. Biokonverzia je dvojstupňová, využíva dve membránovo viazané dehydrogenázy na produkciu kyseliny fenyloctovej. Táto práca je zameraná na optimalizáciu konverzie a overenie operačnej stability imobilizátov.

Materiál a metódy: Enkapsulácia biokatalyzátora prebiehala na enkapsulátore so vzduchovou tryskou. Pri enkapsulácii bol použitý špeciálne tvarovaný viacslučkový reaktor, ktorý zabezpečil uniformitu kapsúl a precízne kontrolovanie reakčného času polyelektrolytových roztokov. Analýza látok prebiehala na vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii. Štruktúra a veľkosť kapsúl, rovnako ako samotný *Gluconobacter oxydans* boli pozorované pomocou rôznych mikroskopických techník ako optický mikroskop, mikroskop atomárnych síl (AFM) a skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM).

Výsledky a diskusia: Po optimalizácií základných parametrov biokonverzie sa pripravili imobilizáty. Enkapsulované baktérie boli porovnané s voľnými baktériami. Zavedenie kroku imobilizácie do výrobného procesu umožňuje opakované využitie baktérií bez prípravy nového inokula, kontinualizáciu procesu a odpadá tiež nutnosť separácie biokatalyzátora od produktu. V porovnaní s voľnými bunkami enkapsulované preparáty vykázali dlhšiu životnosť a výrazne zvýšenú operačnú stabilitu s miernym poklesom aktivity.

Záver: V tejto práci sa jednoznačne podarilo preukázať pozitívny vplyv enkapsulácie baktérie *Gluconobacter oxydans* pri vsádzkovej produkcii kyseliny fenyloctovej, z hľadiska zvýšenej ochrany voči toxickému účinku substrátu na bunky, ako aj zvýšenia operačnej stability a dlhodobého zachovania aktivity buniek. Takto optimalizovaný proces je vhodný na produkciu bioaróm aj v priemyselnom meradle.

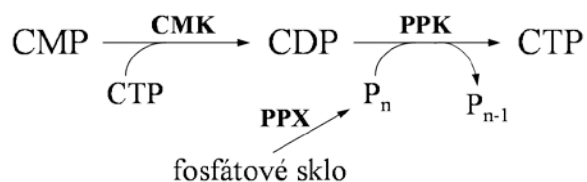
Pod'akovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0302-10 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a SAV VEGA (grant č. 1/0229/12). Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Aplikovaný výskum v oblasti priemyselnej biokatalýzy, kód ITMS: 26240220079, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

SYNTÉZA CTP *IN VITRO* KASKÁDOU ENZÝMOVÝCH REAKCIÍ

Klaudia Talafová, Eva Hrabárová, Jozef Nahálka

Chemický ústav SAV – Centrum glykomiky Bratislava, Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu Nitra

Úvod: Biokatalýza v rámci konceptu „zelenej chémie“ by mala v budúcnosti nahradiť chemické procesy vyžadujúce extrémne podmienky (napr. vysoká teplota, tlak, toxické kovy). V súčasnosti je však obmedzená prevažne na jedнокrokovú konverziu izolovanými enzýmami alebo celými bunkami, čo veľakrát nevyhovuje požiadavkám priemyslu. Preto sa objavujú snahy o organizovanie enzýmov do *in vitro* metabolických dráh. Inklúzne telieska (IB) majú veľký potenciál pre využitie v biokatalýze ako prirodzene imobilizované enzýmy, ľahko izolovateľné, stabilné, s dobrými procesnými vlastnosťami. Cieľom našej práce bolo navrhnúť vhodný spôsob syntézy CTP *in vitro*. Reakcia pozostávala z kaskády reakcií katalyzovaných enzýmami, a to polyfosfatázou (PPX), cytidylátkinázou (CMK) a polyfosfátkinázou (PPK) (Obr. 1). Prebiehali dve nezávislé reakcie, v jednej boli PPX, CMK a PPK vo forme IB, v druhej bola PPX v solubilnej forme.

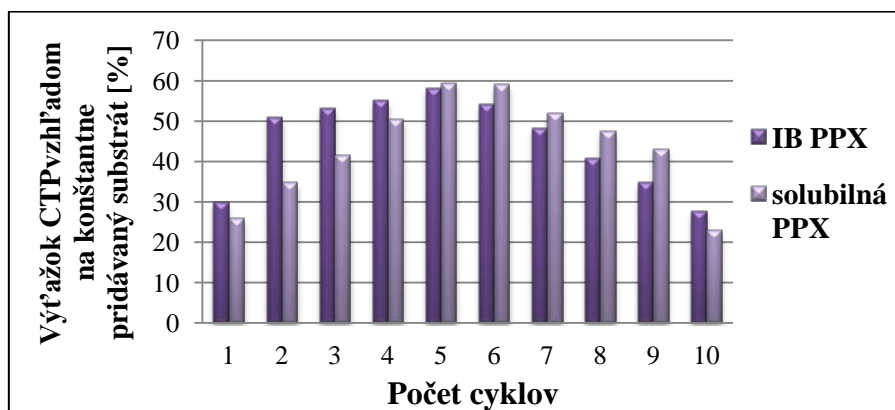


Obr. 1: Schéma syntézy CTP *in vitro* spriahnutím troch enzýmov.

Materiál a metódy: Gény pre PPK, CMK a PPX zo *Silicibacter pomeroyi* boli naklonované do vektora pET-34b(+), resp. PPX aj do vektora pET-51Ek/LIC a exprimované v hostiteľskom kmeni *E.coli* BL21 (DE3). Enzýmy boli izolované neiónovým lytickým detergentom. Prvou fázou bolo štiepenie fosfátového skla pomocou PPX (50 mM MgCl₂, pH 7,8) pri 30°C počas 12 hodín. Následne sa pridala reakčná zmes (15 mM CMP, 5 mM CTP, 15 mM MgCl₂). V časových intervaloch sa pridávalo 15 mM CMP a 15 mM MgCl₂. Jeden cyklus prebiehal 24 hodín pri 30°C a udržiavalo sa pH 7,8-8. Na konci cyklu sa po centrifugácii odobrala polovica objemu supernatantu a pridala sa nová reakčná zmes (15 mM CMP, 15 mM MgCl₂). Výsledky boli získané analýzou vzoriek pomocou HPLC.

Výsledky a diskusia: Experiment ukazuje syntézu CTP *in vitro* spriahnutím reakcií katalyzovaných tromi enzýmami (PPX, CMK a PPK), pričom substrátom je CMP a nerozpustné fosfátové sklo. PPX zo *S. pomeroyi* má endofosfatázovú aktivitu (ako zatiaľ prvá u prokaryotov), a teda hydrolyzuje fosfátové sklo na kratšie solubilné reťazce, z ktorých

PPK odštiepuje fosfát a syntetizuje CTP z CDP. Nerozpustnosť IB bola využitá na opakované použitie enzýmov vo viacerých cykloch reakcie. Recyklácia bola možná aj použitím solubilnej PPX, ktorá zrejme zostala naviazaná väzbovou doménou na svojom nerozpustnom substráte. Prebehlo 10 cyklov, pričom výťažok CTP bol najvyšší pri IB PPX po piatom a pri solubilnej PPX po piatom a šiestom cykle. V ďalších výťažok CTP postupne klesal (Obr. 2).



Obr. 2: Porovnanie konečného výťažku CTP v jednotlivých cykloch.

Záver: Spriahnutím reakcií katalyzovaných enzýmami PPX, CMK a PPK dochádza k efektívnej syntéze CTP *in vitro*, pričom enzýmy je možné opakovane použiť vo viacerých cykloch uvedenej reakcie. CTP môže byť následne využitý v ďalších reakciách, napríklad na prípravu kyseliny CMP-sialovej.

Pod'akovanie: Program Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný z ERDF.

Zoznam účastníkov



1.	Balážová Mária, PhD., Mgr.	simockova@gmail.com
2.	Bertók Tomáš, Ing.	chemtobe@savba.sk
3.	Birošová Lucia, Ing., PhD.	lucia.birosova@stuba.sk
4.	Bombarová Marta, RNDr, PhD.	bombarova@saske.sk
5.	Borko Ľubomír, Mgr.	lubomír.borko@savba.sk
6.	Danihelová Martina, Mgr., PhD.	martina.danihelova@stuba.sk
7.	Dolejš Igor, Ing.	igor.dolejs@stuba.sk
8.	Dolinská Michaela, MVDr., PhD.	dolinska@saske.sk
9.	Grman Marián, Mgr.	grman.marian@gmail.com
10.	Halaburková Andrea, Dott.	andrea.halaburkova@gmail.com
11.	Hano Milan, Mgr.	milan.hano@savba.sk
12.	Hatok Jozef, RNDr., PhD.	hatok@jfmed.uniba.sk
13.	Heizer Tomáš, Ing.	tomas.heizer@stuba.sk
14.	Hil'ovská Lucia, RNDr.	lucia.hilovska@student.upjs.sk
15.	Hudec Roman, Ing., PhD.	roman.hudec@stuba.sk
16.	Illésová Anikó, Mgr.	chemilan@savba.sk
17.	Jašková Katarína, Mgr.	katarina.jaskova@savba.sk
18.	Jendželovská Zuzana, RNDr.	zuzana.papcova@student.upjs.sk
19.	Kaločayová Barbora, Mgr.	barbora.kalocayova@gmail.com
20.	Kaňková Zuzana, RNDr.	z.kankova@gmail.com
21.	Kotlarová Lucia, Mgr.	viruluko@savba.sk
22.	Košík Ivan, RNDr., PhD.	virukosi@savba.sk
23.	Klačanová Katarína, Ing., PhD.	katarina.klaczanova@jfmed.uniba.sk
24.	Kliková Katarína, RNDr.	klikova@jfmed.uniba.sk
25.	Lichvárová Lucia, Mgr.	lucia.lichvarova@savba.sk
26.	Messingerova Lucia, Mgr.	lucia.messingerova@savba.sk
27.	Mišák Anton, Mgr.	anton.misak@savba.sk
28.	Novák Petr, MUDr., PhD.	petr.novak@savba.sk
29.	Nováková Jana, RNDr., PhD.	j.novakova@savba.sk
30.	Pilchová Ivana, Mgr.	iv.pilchova@gmail.com
31.	Práznovská Margaréta, Mgr.	virumarp@savba.sk
32.	Richterová Romana, MUDr.	romana.richterova@gmail.com
33.	Santosh Jadhav M.Sc.	santosh.jadhav@savba.sk
34.	Seč Peter, Ing.	peter.sec@savba.sk
35.	Stramová Zuzana, RNDr.	zuzana.strama@gmail.com
36.	Šedivá Alena, Mgr.	a.sediva@savba.sk
37.	Schenk Mayerová Andrea, Ing.	chemasch@savba.sk

38.	Štefaniková Andrea, Ing.	stefanikova@jfmed.uniba.sk
39.	Talafová Klaudia, RNDr.	klaudia.talafova@savba.sk
40.	Tišáková Lenka, RNDr.	lenka.tisakova@savba.sk
41.	Turáková Katarína, Ing.	katarina.turakova@stuba.sk
42.	Vandžurová Anna, RNDr.	anka.vandzurova@gmail.com
43.	Vargovič Peter, Ing., PhD.	peter.vargovic@savba.sk
44.	Víchová Bronislava, RNDr., PhD.	vichova@saske.sk
45.	Zajkoska Petra, Ing.	petra.zajkoska@stuba.sk

Odborná komisia

1.	prof. RNDr. Marta Kollárová, DrSc. – predseda	kollarm@fns.uniba.sk
2.	RNDr. Imrich Barák, DrSc.	imrich.barak@savba.sk
3.	doc. Ing. Albert Breier, DrSc.	albert.breier@stuba.sk
4.	prof. RNDr. Peter Fedoročko, CSc.	peter.fedorocko@upjs.sk
5.	doc. MVDr. Juraj Koppel, DrSc.	koppel@saske.sk
6.	doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.	boris.lakatos@stuba.sk
7.	doc. RNDr. Peter Pristaš, CSc.	pristas@saske.sk
8.	doc. RNDr. Peter Račay, CSc.	racay@jfmed.uniba.sk
9.	Ing. Zdena Sulová, DrSc.	zdena.sulova@savba.sk
10.	doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc.	Ernest.sturdik@stuba.sk

Sponzori Drobnicovho memoriálu

1. ProScience Tech, s.r.o.	
2. Beckman Coulter Slovenská republika s. r. o.	
3. BioTech, a.s.	
4. Roche Slovakia	
5. SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.	
6. Thermo Scientific / Fermentas GmbH	
7. Ecomed, s.r.o.	
8. Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.	
9. hameln rds, a.s.	
10. STUVITAL, s. r. o.	

Efektívne laboratórium je naša priorita

Kľúčom k úspechu akéhokoľvek vedecko-výskumného projektu je optimálne technologické a materiálové vybavenie. ProScience Tech ponúka **komplexné služby pre rôznorodý typ výskumných činností**, od základného až po aplikovaný výskum, na úrovni akademických inštitúcií aj komerčných spoločností.

Vybudovanie kvalitného zázemia výskumu si vyžaduje komplexný pohľad. ProScience Tech vystupuje v pozícii **integrátora riešení** technologického a materiálového vybavenia. To, že neprezentujeme jednu značku, platformu alebo technológiu, nám dáva potrebnú **nezávislosť** a schopnosť priniesť zákazníkovi **optimálne riešenie v akejkolvek oblasti výskumu**.



Služby

- **Audit procesov**
- **Prieskum trhu a vyhodnotenie**
- **Poradenstvo a referencie v oblasti výskumných technológií**
- **Strategické poradenstvo**
- **Realizácia dodávok**
- **Transfer technológií**

Pre priame konzultácie navštívte prosím našu stránku **www.prosciencetech.sk**

ProScience Tech s.r.o., Dobšinského 20, 811 05 Bratislava

www.prosciencetech.sk

Tel: +421 2 207 21 099

Fax: +421 2 207 21 099

E-mail: info@prosciencetech.sk



Váš partner vo vede, výskume a diagnostike

Široká škála reagensií a kitov pre :

- ✓ Genomiku
- ✓ Proteomiku
- ✓ Bunkovú biológiu
- ✓ Molekulárnu biológiu

Špičkové systémy pre :

- Real-Time PCR
- Automatizovanú extrakciu NK
- Next-Gen Sekvenovanie DNA
- Bunkovú biológiu
- Sequence Capture - Microarray

www.roche-applied-science.com

www.roche-diagnostics.com

vladislav.cucak@roche.com

(tel: +421 918 707 774)



ECOMED

DIAGNOSTICKÁ PRE

- BIOCHÉMIU
- IMUNOLÓGIU
- SEROLÓGIU
- HEMOKOAGULÁCIU
- ELEKTROFORÉZU
- OXIDAČNÝ STRES
- GENETIKU-SONDY(FISH)
- DROGOVÚ ZÁVISLOSŤ
- SYNTECKÝ IMERZNÝ OLEJ
- PRESNÉ pH-PUFRE

LABORATÓRNE PRÍSTROJE

- BIOCHEMICKÉ A HEMATOLOGICKÉ ANALYZÁTORY
- ELFO SYSTÉMY
- PIPETOVACIA TECHNIKA
- ODSTREDIVKY
- SUŠIČKY A STERILIZÁTORY
- INKUBÁTORY
- LAMINÁRNE BOXY
- PCR BOXY
- MIEŠAČKY A TREPAČKY
- pH-METRE NA BÁZE ISFET

SPOTREBNÝ A PODPORNÝ MATERIÁL

- GENERÁTORY ANAERÓZY
- MIKROBIOLOGICKÉ KLUČKY
- LABORATÓRNE STOJANY
- KAZETY NA HLBOKÉ ZMRAZOVANIE
- SKÚMAVKY A MIKROSKÚMAVKY
- KRYOGENICKÉ SKÚMAVKY
- PCR SKÚMAVKY, STRÍPY A PLATNE
- KRYCIE FÓLIE
- PIPETOVACIE ŠPIČKY, AJ ŠPECIÁLNE
- MATERIÁL NA OZNAČOVANIE SKÚMAVIEK
- TRENŠPORTNÉ CHLADIACE KUFRÍKY,
- SYSTÉM NA FARBenIE PREPARÁTOV
- OCHRANNÉ RUKAVICE
- PARAFILM
- ĎALŠIE POMÔCKY

Ponúkame Vám širokú škálu kvalitných laboratórnych prístrojov, pomôcok, diagnostických súprav a spotrebného materiálu, z ktorého vyberáme:



www.ecomed.sk email:ecomed@isternet.sk tel:041/5006744,45
fax:041/5006746

**MoFlo®
Astrios™**
Cell Sorter

Biomek®
Laboratory Automation

Optima™ XE/XPN
New Generation
of Ultracentrifuges



www.beckman.com
www.coulterflow.com

60,000 antibodies, 100% Bioguaranteed.

Sigma® Life Science has *the* antibody
for your research needs.

Find your antibody:

sigma.com/antibodyexplorer

To order, contact:

Sigma-Aldrich Česká republika

Phone: +420 246 003 200

czeorders@sial.com

Sigma-Aldrich Slovensko

Phone: +421 02/555 71 562

svkorders@sial.com

*Experimental results must be submitted via the Antibody Bioguarantee Form within 12 months of the date of purchase. All required fields of the Antibody Bioguarantee Form must be completed. Refunds and replacements contingent to claim review by technical service team. Credit covers the cost of antibody. Product replacements depend on product availability.

©2013 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA and SIGMA-ALDRICH are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. Where bio begins is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC.

SIGMA-ALDRICH

SIGMA Where *bio* begins™
Life Science

sh6314



Hameln rds a.s., Modra, Slovakia

Research and Development activities of Hameln rds, a.s. are focused on following areas:

- **API's development and research**
 - **Pharmaceutical development (analytical and galenical development)**
 - **Biological research**
 - **Biomedical research**
-
- **API's development and research** is focused on the development and optimisation of API synthesis at the laboratory level. Moreover, the work is focused on the development and improvement of the purification process in order to produce the final laboratory batches of API, qualification and synthesis of possible impurities during API synthesis in order to prepare all documents required for the compilation of European DMF (Drug Master File) for the synthesised API.
 - **Analytical development** and research includes development of analytical methods in accordance for registration documentation and corresponding Pharmacopoeia. All methods are validated according to ICH. We can provide stability testing for all dosage forms. Batch release to the European market is performed by our own Qualified Person.
 - **Galenical development and research** is focusing on the development of solid, semi-solid and liquid dosage forms as well as lyophilisates. This includes pre-formulation studies, development of dosage forms, production of laboratory batches and preparation of documentation required for submission and registration.
 - **Biological research** is mostly focused on development activities which require the use of different test systems (cells, *in vitro* systems, experimental animals, etc.). These activities are performed as part of the development of new drugs, evaluation of drug safety, safety of chemical substances, food additives or medical devices. Furthermore, these include evaluation of efficacy of substances at the cellular and sub-cellular level, preclinical evaluation of drug efficacy with focus on pharmacology and pharmacokinetics, evaluation of *in vivo* safety of drug and its toxicity as a function of dosing and route of administration.
 - **Biomedical research** is focused on clinical evaluation of drug safety, at the moment mostly in the field of Bioequivalence and phase II studies.



SK: 0800 1 24 683
biotech@biotech.sk
www.biotech.sk

Bio REVUE

Horúca novinka

CYTATION|3
Imaging reader

...Digitálna mikroskopia
na mikroplatničkách...



Think Possible

 **BioTek**

www.biotech.sk

Eppendorf Tubes® 5.0 mL

Vyžiadajte si vzorku zdarma na: eppendorf@eppendorf.sk



Chýbajúci medzičlánok

5 ml skúmavka má všetky výhody svojich menších príbuzných „eppendorfiok“.

Nová 5 ml Eppendorf skúmavka je vybavená pripojeným viečkom, ktoré sa ľahko otvára a zatvára jednou rukou, má vysokú mechanickú odolnosť, zvládne centrifugáciu do 25 000 x g. Vyrába sa podľa vysokých kvalitatívnych štandardov firmy Eppendorf, len z najkvalitnejšieho plastu, nie sú používané žiadne aditíva, ktoré by mohli ovplyvniť následné aplikácie. Skúmavka je dostupná v rôznych certifikovaných stupňoch čistoty (viď. informácie pre objednanie), odolná na prácu a skladovanie v intervale teplôt -86 °C až 80 °C. Inkubovať možno aj nad 80 °C, na prácu pri týchto teplotách sa doporučuje použiť poistku na viečko (tube clip).

www.eppendorf.sk

Pri práci s objemami do 5 ml sú výhody novej skúmavky oproti 15 ml kónickej skúmavke zreteľné:

- > Menšie nebezpečenstvo kontaminácie možno pracovať so štandardnými špičkami a pipetami, ľahko sa dosiahne na dno.
- > Je potrebný menší skladovací priestor.
- > 5 ml Eppendorf skúmavku možno integrovať do väčšiny postupov, kde sa pri práci s objemami do 5 ml používajú kónické 15 ml skúmavky - tvar ich spodnej časti je identický.

August 5, 2013

Vec: Fermentas GmbH in St. Leon-Rot Germany changing legal entity name to Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH effective September 2, 2013

Vážený zákazník,

Radi by sme Vás informovali, že Fermentas GmbH, náš právny subjekt v St. Leon-Rot Germany, bude premenovaný na **Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH od 2. Septembra 2013**.

Názov sa mení z globálneho hľadiska zjednotiť naše Thermo Scientific molekulárno-biologické produktové línie a vyhovieť zákazníckym požiadavkám zjednodušením zložitosti našej organizácie. Táto zmena zahŕňa integráciu nasledujúcich piatich molekulárno-biologických línií:

- ABgene – PCR a qPCR produkty
- Finnzymes – PCR a qPCR produkty
- Fermentas – enzýmy a produkty pre molekulárnu biológiu
- Dharmacon – RNAi a syntetizovaná RNA
- Open Biosystems – RNA a génová expresia

Srdečne Vás žiadame, aby ste aktualizovali a zahrnuli túto zmenu do 2. Septembra 2013 vo Vašom účtovnom, nákupnom a s nimi spojenými systémami.

Radi by sme boli aby objednávky, dodávky tovarov a faktúry boli spracovávané naďalej bez meškania a preto Vás prosíme dajte tento list na vedomie relevantným oddeleniam ako napríklad oddelenie nákupu a oddelenie účtovníctva.

Všetky ostatné údaje firmy (ako napríklad, adresa, IČO, IČDPH, číslo účtu, a kontaktné informácie) zostávajú nezmenené.

Ak máte zmluvu, kde je Fermentas GmbH ako zmluvná strana, zmluva bude pokračovať.

Proím zoberte na vedomie: Ak máte obchodný vzťah s niektorým iným právnym subjektom Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific alebo distribútorom, táto zmena neovplyvňuje Vaše obchodovanie s týmito právnymi subjektami.

Ak máte ďalšie otázky ohľadom zmeny názvu, prosím Vás kontaktuje Angelika Mertens, manager pre právne záležitosti, angelika.mertens@thermofisher.com

Na všetky ďalšie otázky Vám rád odpovie náš zákaznícky servis cs.molbio.eu@thermofisher.com
tel. 00800 222 00 888.

Ďakujeme za Vašu spoluprácu.

S pozdravom,

Dr. Frank Schestag
General Manager
Thermo Fisher Scientific

**Aby sa predišlo omeškaniam – prosím zmente súčasnú verziu dát do 2. septembra 2013.
Ďakujem.**