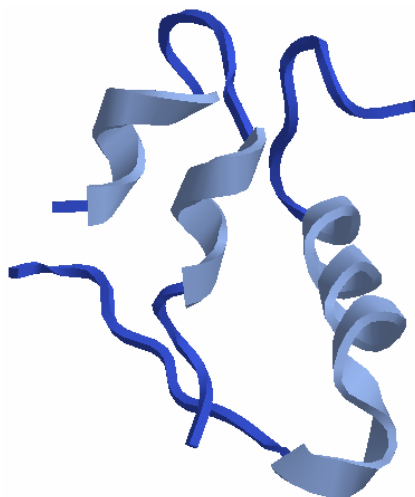




SIGMA-ALDRICH



**VI KONFERENCE MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH VĚDECKÝCH A
VÝZKUMNÝCH PRACOVNÍKŮ Z OBORŮ CHEMIE, BIOCHEMIE,
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A OBORŮ PŘÍBUZNÝCH,
POŘÁDANÁ FIRMOU SIGMA-ALDRICH**

14.6. – 17.6. 2006

Devět skal - Žďárské vrchy

sborník redigovali

Radmila Řápková, Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

VI Mezioborové setkání mladých vědeckých a výzkumných pracovníků z oborů chemie, biochemie, molekulární biologie a oborů příbuzných

Byl jsem požádán editorem, abych napsal úvodní slovo ke sborníku prací VI. mezioborové konference mladých biologů a chemiků. Protože je to již šestá konference, asi těžko vymyslím originální provolání přání zdaru, či zbrusu nové provolání radosti nad tím, že projekt, který jsme před mnoha lety spolu s dalšími nadšenci začali, zdárně pokračuje. Když jsem zmínil nadšence, chtěl bych poděkovat celému týmu, který se na organizaci nyní podílí. Snahou je, obsáhnout jak oborovou pestrost oponentů, tak jejich geografické rozmístění po celé republice. Nyní v odborné komisi pracují (uvádím jména bez titulů, protože než tento sborník vyjde, určitě dojde změnám, jak tomu bylo zatím u každého ročníku) : Jaroslav Blahoš, ÚEM AVČR, Praha, Jiří Damborský, MU, Brno, Pavel Drašar, VŠCHT, Praha, Libor Grubhoffe JU, České Budějovice, Martin Kotora, PřF UK, Praha, Jitka Moravcová, VŠCHT, Praha, Šárka Pospíšilová, FN, Brno, Ivo Starý, UOCHB AV ČR, Praha, Jitka Ulrichova, UP, Olomouc. Všem mockrát děkuji a velmi si vážím jejich ochoty pomoci s náročným výběrem. A nejen to, mám velikou radost, že s těmito předními odborníky mohu spolupracovat a učit se od nich. Nejradosnější však je, že kvalita přihlášených prací se stále zvyšuje, a přitom průměrný věk přihlášených se stále snižuje. Práci komise to komplikuje, protože vybrat těch 65 nejlepších prací pro osobní presentaci na konferenci není vůbec jednoduché. Ale je to rozhodně velmi milá komplikace. Je vidět, že biochemie, biologie, molekulární biologie, chemie a všechny příbuzné obory se rozvíjejí velmi dynamicky a mladí lidé o ně mají zájem. Snad tato konference pomáhá v prohlubování tohoto zájmu a usnadní budoucí komunikaci mezi jednotlivými vědci a vědeckými týmy.

Tento sborník se připravuje v měsíci březnu 2006, samotná konference se bude konat v červnu 2006. Ted' je za oknem minus pět stupňů, občas sněží a zima 2005-2006 se zdá být nekonečná. Rozhodně je to dobrá doba na práci v laboratoři, nebo studium v knihovně..... Samotná konference je ale plánována na polovinu června a tak si nyní hlavně přeji, aby bylo příznivé počasí, aby všichni, co byli vybráni mohli přijet a aby se všem, jak organizátorům, tak soutěžícím, na konferenci velmi líbilo.

mf

MUTAGENEZE LEKTINU PA-III. A SOUVISEJÍCÍ ZMĚNY V AFINITNÍM CHOVÁNÍ VŮČI SACHARIDŮM – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝPOČETNÍ STUDIE

JAN ADAM^a, MARTINA POKORNÁ^a, MARTIN PROKOP^a, ZDENĚK KRÍŽ^a, ANNE IMBERTY^c, JAROSLAV KOČA^a, and MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,b}

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul a ^bKatedra biochemie, PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno ^cCERMAV-CNRS, 601 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble, Francie

Pseudomonas aeruginosa je příležitostným lidským patogenem schopným napadat lidské tkáně, je-li snížena celková imunita organismu. Dva lektiny produkované touto bakterií mají velký význam stran její virulence. Mimoto, ačkoli většina známých lektinů má vůči monosacharidům malou afinitu, lektin PA-III vykazuje vysokou afinitu vůči L-fukose – rovnovážná disociační konstanta zde leží v mikromolární oblasti¹.

Srovnáním s databází bakteriálních genomů byla odhalena existence podobných lektinů v dalších podmíněných patogenech. Jeden z nich, fytopatogen *Ralstonia solanacearum*, produkuje lektin RS-III, preferující však D-mannosu². Srovnání PA-III s krystalovou strukturou lektinu RS-III poukázalo na fakt, že za afinitní změny je pravděpodobně zodpovědná triáda aminokyselin v „sacharid-vázající smyčce“, což bylo potvrzeno experimenty s designovanými, připravenými a krystalizovanými mutanty PA-III. Pro stanovení termodynamických parametrů interakce byla využita isotermální titrační mikrokolorimetrie.

Paralelně s experimentálním studiem interakcí těchto mutantů byl zahájen projekt využívající metod výpočetní chemie. Prostřednictvím mutagenese *in silico* a dokovacích experimentů za předpokladu výsledků korelujících s experimentálními daty, cílem tohoto projektu je vyvinout spolehlivou *in silico* metodu pro předpovídání budoucích interakcí.

LITERATURA

1. Mitchell E.P., Sabin C., Šnajdrová L., Pokorná M., Perret S., Gautier C., Hofr C., Gilboa-Garber N., Koča J., Wimmerová M., Imberty A.: Proteins: Struct. Func. Bioinform. 58, 735 (2005).
2. Sudakevitz D., Kostlánová N., Blatman-Jan G., Mitchell E., Lerrer B., Wimmerová M., Katcoff D.J., Imberty A., Gilboa-Garber N.: Mol. Microbiol. 52, 691 (2004).

ROLE METALOTHIONEINU PŘI DIAGNOSTICE A PRŮBĚHU NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

VOJTĚCH ADAM^{a,b}, JITKA PETRLOVÁ^b, ONDŘEJ BLAŠTÍK^b, MICHAL SVOBODA^b a RENÉ KIZEK^b

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bÚstav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno
ilabo@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

Nádorová onemocnění jsou celosvětově zodpovědná za 7 milionů úmrtí ročně a podle Světové zdravotnické organizace jejich počet bude v nejbližších letech růst. Nejen z tohoto důvodu vyhlásilo mnoho zemí po celém světě programy zaměřené na pokles výskytu zhoubných onemocnění v populaci. Jedním z cílů programu vypsání Ministerstvem zdravotnictví ČR a Českou onkologickou společností je zlepšení časné diagnostiky mezi něž náleží i hledání nových potencionálních markerů tohoto zhoubného onemocnění. Jak se ukazuje, jedním z nových potencionálních markerů by mohl být protein metalothionein (MT). MT patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6–10 kDa. Nejnovější výzkumy naznačují, že pravděpodobně existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru. V naší práci jsme se zaměřili na potvrzení hypotézy metalothioneinu jako potencionálního nádorového markeru. Pro tyto účely jsme využili různých elektrochemických technik. Nejprve jsme se snažili zvolit a optimalizovat techniku vhodnou pro stanovení velmi malých koncentrací MT nejen pro jeho samotnou sensitivní detekci, ale především pro možnost sledování jakýchkoliv změn jeho hladiny v lidském organismu. Pro tyto účely jsme optimalizovali chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu (CPSA) ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou (AdTS), kde jsme dosáhli detekčního limitu 11 zmol. Souběžně s optimalizací techniky AdTS CPSA jsme se zaměřili na ověření metalothioneinu jako nádorového markeru. Pro tyto účely jsme AdTS ve spojení s diferenční pulsní voltametrií – Brdičkova reakce. Před více než sedmdesáti lety objevil Rudolf Brdička katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů. Tato metoda byla dále vylepšena a využita pro analýzu proteinů krevních sér pacientů s nádorovým onemocněním. Celkem jsme analyzovali krevní séra 72 pacientů, u nichž bylo diagnostikován melanom, nádor prsu, plic, štítné žlázy, ledvin, jícnu, tlustého střeva, anebo lymfoidní leukémie. U všech typů zhoubných nádorů byl pozorován nárůst obsahu MT 2 až 5krát v porovnání s hladinou zdravých lidí, která je okolo 0,6 μM. Zjistili jsme, že nejvyšší obsah MT byl v krevním séru pacientů s nádory prsu, u nichž byl průměrný obsah MT 1,6 μM, přičemž u 9 pacientů překročila hladina MT 1 μM (64 %). V případě pacientů s melanomem byla průměrná hladina MT 1,97 μM. U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT absolutně nejvyšší a dosahovala hodnot 3,2 μM. Z námi získaných experimentálních výsledků je zřejmé, že hladina sérového MT výrazně stoupá u většiny pacientů se zhoubnými nádory.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GA ČR 525/04/P132.

LITERATURA

1. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: Anal. Chem. 73, 4801 (2001).
2. Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: Bioelectrochemistry 56, 57 (2002).

3. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Nemec M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
4. Prusa R., Blastik O., Potesil D., Trnkova L., Zehnalek J., Adam V., Petrova J., Jelen F., Kizek R.: *Clin. Chem.* 51, A56 (2005).

IMOBILIZACE SOUBORŮ BIOLOGICKÝCH A SYNTETICKÝCH MAKROMOLEKUL NA PEVNÉ POVRCHY

KAROLÍNA BOHATÁ, EDUARD BRYNDA a MILAN HOUSKA

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v Praze, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6

Cílem práce byla tvorba a studium stability multivrstevných systémů globulárních proteinů a polyelektrolytů na pevných površích. Multivrstvy byly vytvořeny pomocí postupné depozice (tzv. layer-by-layer method), která je založena na opakovaném střídání adsorpce proteinu a opačně nabitého polyelektrolytu.

Multivrstevné soubory byly imobilizovány na hydrofobní povrch (polystyrénový film nanesený na ZnSe krystalu). Jejich tvorba a stabilita byla sledována metodou reflexní infračervené spektroskopie (ATR-FTIR Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared). Výzkum byl především zaměřen na studium faktorů (pH, iontová síla, neionogenní detergenty) ovlivňujících tvorbu a stabilitu vícevrstevných systémů složených z bílkovin a polyelektrolytů. Experimenty ukázaly, že tvorba a stabilita multivrstev bílkovin a polyaniontů může být snadno kontrolována pomocí pH roztoku, přičemž lze tyto soubory rozpustit zvýšením pH nad isoelektrický bod bílkoviny. Oproti tomu soubory vytvořené z bílkovin a polykationtů se pouze z části rozpouští při snižování pH pod isoelektrický bod bílkoviny nebo zvyšováním iontové síly okolního roztoku.

Dále byla sledována depozice bílkovin z lidské krevní plasmy na povrchy modifikované multivrstvami sérového albuminu. Nežádoucí usazování bílkovin se podařilo výrazně snížit pokrytím umělého povrchu kovalentně síťovanou albuminovou dvojvrstvou, zatímco depozice byla značně vysoká, jestliže multivrstvy albuminu obsahovaly polykationty.

Potenciálně mohou být vícevrstevné soubory albuminu použity pro biokompatibilní potahování povrchů umělých materiálů přicházejících do kontaktu s krví, nebo k modifikaci povrchů zabraňujících nežádoucímu usazování (anti-fouling) bílkovin z biologických tekutin. Podobně lze multivrstvy obsahující polyklonálních nebo monoklonálních protilátek (IgG typu) použít pro přípravu afinitních povrchů optických imunosenzorů¹ nebo nosičů pro afinitní separační metody.

LITERATURA

1. Brynda E., Houska M., Wikerstål A., Brandenburg A.: *Biosensors Bioelectron.* 17, 665 (2002).

INAKTIVACE p53 A DELECE ATM V SOUBORU B-CLL PACIENTŮ VE VZTAHU K MUTAČNÍMU STATUSU IgVH A LÉČBĚ

SOŇA BUKOVSKÁ^{a,d}, M. TRBUŠEK^{a,d}, J. MALČÍKOVÁ^{a,d}, J. ŠMARDOVÁ^b, J. CHUMCHALOVÁ^{a,d}, X. SVITÁKOVÁ^b, D. MENTZLOVÁ^c, V. LINKOVÁ^c, P. KUGLÍK^c, V. KUHRVÁ^{a,d}, H. FRANCOVÁ^{a,d}, M. DOUBEK^d, Y. BRYCHTOVÁ^d a J. MAYER^d

^aCentrum molekulární biologie a genové terapie FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno, ^bPatologicko-anatomický ústav FN Brno, ^cOddělení lékařské genetiky FN Brno, ^dInterní hematologická klinika FN Brno sonabu@email.cz

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je nejčastější leukémií v západním světě. B-CLL je běžnými přístupy neléčitelná. Mutace a delece ATM a p53, spolu s mutačním statusem imunoglobulinového řetězce (IgVH) patří mezi nejdůležitější negativní prognostické faktory – p53 má navíc vliv i na léčbu (resistence na chemoterapii). Za fyziologické situace je hladina p53 velmi nízká, kinasa ATM v buňkách stabilizuje a aktivuje klíčový tumor-supresor p53 prostřednictvím fosforylace - a to v případě poškození DNA nebo v přítomnosti genotoxického stresu. Pokud je p53 mutován, není degradován a akumuluje se v buňce tato vysoká hladina proteinu je považována za negativní prognostický marker.

Delece genů ATM a p53 mapujeme cytogeneticky prostřednictvím FISH hybridizací, funkční status p53 stanovujeme pomocí analýzy FASAY, konkrétní mutace v p53 vyhledáváme sekvenováním a expresi tohoto proteinu monitorujeme Western-blotem. Dále máme k dispozici data o mutačním statusu IgVH. V souboru 168 pacientů jsme pozorovali 16 případů mutací p53 (9,5 %), všechny tyto mutace byly identifikovány sekvenováním. Delece ATM se vyskytla ve 21 případech (18 %), pouze jediný pacient měl paralelní mutaci p53 a ATM. V tomto souboru jsme pozorovali velmi silnou asociaci mezi delecí ATM a nemutovaným IgVH, též mezi mutovaným p53 a nemutovaným IgVH. Nezaregistrovali jsme vliv léčby na vznik mutací p53.

Na tomto dobře charakterizovaném souboru pacientů provádíme testy cytotoxicity – kombinace různých cytostatik a cytostatik a monoklonálních protilátek.

Tento výzkum směřuje k racionalizaci využívání kombinací chemoterapeutik u pacientů s B-CLL na základě statusu molekulárně-biologických faktorů.

NOVÉ SELEKTIVNÍ INHIBITORY CDK

PETR CANKAŘ^a, IVETA FRYŠOVÁ^a, JAN SLOUKA^a, VLADIMÍR KRYŠTOF^b, PETER M. FISCHER^c a MIROSLAV STRNAD^b

^aKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc;

^bLaboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AVČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc; ^cThe School of Pharmacy, University of Nottingham, University Park, Nottingham, NG7 2RD, The United Kingdom

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) řídí důležité vnitrobuněčné procesy, jako je buněčný cyklus, transkripce či apoptóza. Díky své důležitosti v uvedených procesech se záhy staly významným cílem nových potencionálních chemoterapeutik cílených zvláště proti nádorovým onemocněním¹ a některé z nich jsou již ve druhé fázi klinického testování^{2,3}. Dále se uvažuje o možných farmakologických aplikacích v oblasti inhibice replikace virů a zamezení množení některých buněčných parazitů².

Rutinním testováním heterocyklických sloučenin byla identifikována nová skupina látek inhibujících katalytickou aktivitu CDK2/cyklin E kinasy. Základní sloučenina 3,5-diamino-4-fenylazopyrazol však vykazovala jen slabou inhibiční schopnost. Systematickým obměňováním substituentů na fenylové skupině (studiem vztahů mezi substitucí a inhibiční aktivitou) bylo zjištěno, že hydroxy a nitroderiváty patří mezi nejúčinnější inhibitory.

S nejsilnějším inhibitorem byly provedeny další biochemické a biologické testy⁴. Kinetickým měřením bylo potvrzeno, že se jedná o kompetitivní inhibitor soutěžící ve vazebném místě s ATP, což bylo dále dokázáno pomocí rentgeno-strukturní analýzy krystalu CDK2 s inhibitorem. Rovněž byla zjištěna selektivita tohoto inhibitoru na panelu rekombinantních proteinkinás s překvapivě jedinečnou afinitou k CDK9/cyklin T1 kinase, která je součástí transkripčního elongačního faktoru P-TEFb. Inhibitor byl schopen blokovat proliferaci lidských nádorových buněčných linií MCF7, HOS, G361 a K562. Na základě získaných poznatků vztahu struktury a biologické aktivity jsou dále tyto inhibitory modifikovány za účelem vyšších inhibičních schopností CDK a lepší permeability skrz buněčné membrány.

Tato práce vznikla na základě finanční podpory MŠMT ČR v rámci výzkumného záměru MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Sielecki T.M., Boylan J.F., Benfield P.A., Trainor G.L.: J. Med. Chem. 43, 1 (2000).
2. Meijer L., Raymond E.: Acc. Chem. Res. 36, 417 (2003).
3. Benson C., Kaye S., Workman P., Garret M., Walton M., de Bono J.: Br. J. Cancer 92, 7 (2005).
4. Kryštof V., Cankar P., Fryšová I., Slouka J., Kontopidis G., Džubák P., Hajduch M., Fischer P.M., Strnad M.: připravováno k tisku.

OXIDATIVNÍ STRES A MITOCHONDRIE PŘI VÝVOJI KVASINKOVÝCH KOLONIÍ

MICHAL ČÁP, LUDEK ŠTĚPÁNEK a ZDENA PALKOVÁ

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

Mnohé mikroorganismy tvoří při růstu na pevném médiu mnohobuněčné útvary – kolonie.

V naší laboratoři se zabýváme koloniemi kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jako modelovými objekty pro studium mnohobuněčných kvasinkových populací. Kolonie rostoucí po dlouhou dobu na médiu s limitovaným množstvím živin je svými vlastnostmi bližší stavu, v jakém se kvasinky nacházejí v přírodě. V koloniích spolu kvasinky mohou interagovat a předávat si různé signály, které pak vedou k rozdílné expresi genů v různých místech kolonie, buněčné diferenciaci nebo vzniku prostorově uspořádaných struktur. Jedním ze signálů, působících mezi koloniemi na dlouhou vzdálenost, je plyný amoniak. Kvasinkové kolonie jsou schopny přijímat a vysílat amoniakový signál, jehož produkce probíhá v pulzech a je doprovázena alkalizací okolního média. Jednotlivé pulsy produkce amoniaku jsou odděleny acidifikací média.

Aby byly odhaleny změny, ke kterým dochází při přechodu do fáze produkce amoniaku, byly provedeny celotranskriptomové studie změn exprese (microarrays) během tohoto přechodu. Bylo nalezeno několik skupin genů, jejichž exprese se mění. Mezi nejnápadnější změny patřilo snížení exprese genů zajišťujících mitochondriální respiraci a současně zvýšení exprese peroxisomálních genů. Tyto výsledky poukazují na změnu metabolismu buněk v koloniích. Další výraznou změnou bylo snížení exprese genů stresové odpovědi, což naznačuje snížení stresové zátěže v kolonii. O tom, jak jsou tyto změny důležité, svědčí studium kmene s delecí v genu SOK2, který není schopen produkovat amoniak a ani u něj nedochází k expresním změnám popsaným výše. Tento kmen vykazuje zhoršené dlouhodobé přežívání buněk v koloniích.

Zajímalo nás, která ze změn je pro přežívání kolonie důležitější, zda přeprogramování metabolismu, nebo ochrana proti stresu. K tomu jsem zvolil studium tří kmenů s delecí ve významných genech oxidativní ochrany (SOD1, SOD2 a CTT1). Tyto kmeny jsem charakterizoval z hlediska produkce amoniaku a dlouhodobého vývoje kolonií. Dále jsem sledoval produkci kyslíkových radikálů a množství a struktury mitochondrií během vývoje kolonií. K objasnění změn, ke kterým dochází při vývoji kolonií u těchto kmenů, jsem sledoval expresi vybraných genů.

Tato práce je podporována grantem GA ČR 525-05-0297, Centrem základního výzkumu LC 531 a doktorským projektem GA ČR 204/03/H066.

STUDY OF THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF CYP3A4

LUKÁŠ ČERVENÝ, PETR PÁVEK, LUCKA ŠVECOVÁ, and FRANTIŠEK ŠTAUD

*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05
cerveny@faf.cuni.cz*

Currently available studies indicate that two nuclear receptors, constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3) and pregnane X receptor (PXR; NR1I2), are involved in transcriptional activation of some cytochrome P450 isoenzymes. PXR and CAR are activated in the presence of a ligand and they bind as a heterodimer with retinoid X receptor (RXR) to proximal PXR response element (prPXRE) and distal xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) that are localized in regulatory regions of the *CYPs*. Recently, it has been found that rifampicine is capable of activating PXR-mediated transcription of *CYP3A4* and substances such as phenytoin and phenobarbital can activate CAR-mediated transcription of *CYP2B6*.

The aim of our study was to test several antiepileptic drugs for their ability to activate CAR- and/or PXR-mediated transcription of *CYP3A4* gene. For this purpose HepG2 cells were co transfected with the human expression vector pCR3-CAR or pSG5-PXR human expression vector and with XREM-CYP3A4-Luc reporter construct inserted into pGL3-basic vector. This construct contained the prPXRE (362/+53) and XREM (7836/-7208) of *CYP3A4* driving luciferase gene expression.

Eight antiepileptic drugs were tested in this model for detection of CAR activators of *CYP3A4* transcription; in particular: primidone, ethosuximid, clonazepam, carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, valproate and lamotrigine. Phenytoin and valproate at a concentration of 25 μM significantly increased CAR-mediated transcriptional activity of *CYP3A4* (1.7 fold and 1.3 fold, respectively). Further, concentration dependence of CAR-mediated transcriptional activation of *CYP3A4* on concentration of valproate was investigated. Increase in the CAR mediated transcriptional activity was observed for all concentrations tested ($\text{EC}_{50} = 177.14 \mu\text{M}$). Additionally, the same concentration range of valproate was used to test PXR-mediated transcriptional activation of *CYP3A4*. Increase of PXR-mediated transcription was observed for all concentrations tested ($\text{EC}_{50} = 305.7 \mu\text{M}$).

Based on these cell-based reporter assays valproate seems to be capable to activate both CAR and PXR and we suppose valproate activates CAR more effectively than PXR. These findings should be proved by further studies (RT-PCR).

SOLUBLE FORMS OF BOAR SEMINAL PLASMA HYALURONIDASE

**M. CIBULKOVÁ^{a,b}, P. MAŇÁSKOVÁ^a,
V. JONÁKOVÁ^a, and M. TICHÁ^b**

^aDepartment of Biochemistry of Reproduction, Institute of Molecular Genetics, AS CR, Prague 6; ^bDepartment of Biochemistry, Charles University, Prague 2

The sperm membrane-bound hyaluronidase (PH-20) is known to be essential for fertilization in different species. However, the male reproductive tract contains also soluble forms of this enzyme, whose role is not fully understood. In some species, it is believed that these soluble forms are

mostly degradation products of the membrane-bound enzyme. In this study, we have investigated different forms of soluble hyaluronidase in boar seminal plasma, that have not been characterized yet.

Two forms of soluble hyaluronidase were detected in boar seminal plasma (rel. mol. masses 50 000 and 65 000) using SDS-electrophoresis and zymographic method. These two forms can be separated by means of affinity chromatography on heparin-Sepharose. They differ besides their affinity to heparin, also in the pH optimum of their enzyme activity. The soluble form with rel. mol. mass 50 000 was active both at the acidic (pH 3.7) and the neutral pH (pH 7.4) and was bound to immobilized heparin. The second form (rel. mol. mass 65 000) was active only at acidic pH and did not interact with heparin. Soluble hyaluronidase with affinity to heparin (50 000) was detected in epididymal fluid and in the SDS-extract of boar spermatozoa. Hyaluronidase of rel. mol. mass 65 000, without affinity to heparin, was found in boar seminal vesicles fluid.

Further studies are necessary to find out a relationship between the soluble forms of boar hyaluronidase and the membrane-bound one and to learn about their physiological function in the reproduction process.

This work was supported by grants No. 303/04/P070 and 303/06/0895 GA CR and by the project AVOZ 50520514 AS CR.

POKROKY V CHARAKTERIZACI LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU Z LAREV MASÁRKY NEOBELLIERIA BULLATA

**ALICE CIENCIALOVÁ^{a,b}, TEREZA
NEUBAUEROVÁ^c, RADEK ŠINDELKA^d, MILOSLAV
ŠANDA^a, JOSEF CVAČKA^a, BOHUMÍR KOUTEK^a
a JIŘÍ JIRÁČEK^a**

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

Objev antibiotik v třicátých letech minulého století znamenal revoluci v historii medicíny. Nadměrné používání antibiotik však vedlo k nárůstu rezistence bakterií vůči antibiotikům. Od roku 1960 do roku 2000, kdy byly zavedeny linezolidy, nebyla na trh uvedena žádná nová třída antibiotik. I přes toto přehlížení některé společnosti stále hledají nové látky s antimikrobiálním účinkem, například na bázi peptidů¹.

Jako zdroj izolace takových peptidů jsme vybrali organismus, který často přichází do střetu s bakteriálními infekcemi masařku *Neobellieria bullata*. K indukci tvorby antibakteriálních peptidů u larev *Neobellieria bullata* jsme používali bakteriální suspenzi. Po několika hodinách inkubaci byla izolována hemolymfa a postupnou centrifugací a srážením byly odděleny frakce obsahující

nízkomolekulární peptidy a proteiny. Získané frakce byly dále děleny chromatografickými metodami. Izolované látky byly charakterizovány pomocí SDS-PAGE, MALDI nebo ESI hmotnostní spektrometrií. Antimikrobiálně aktivní proteinové a peptidové frakce byly identifikovány *N*-terminální sekvenací a analýzou tryptických štěpů MALDI-MS nebo ESI-MS/MS a porovnáním s údaji v databázích. Antimikrobiální aktivita frakcí byla detekována metodou vyhodnocování odezvy růstu patogenních mikroorganismů v závislosti na přítomnosti testované látky. Pro testování byly použity bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. V izolovaných frakcích se nám podařilo identifikovat již známé antimikrobiální peptidy, 40 aminokyselinový sapecin a dipeptid β -alanyltyrosin. Antimikrobiální aktivitu vykazovala také frakce identifikována jako transferin a zatím neidentifikovaný 16 kDa protein. Izolovaný β -alanyltyrosin byl analyzován pomocí ionexové chromatografie s ampérometrickou detekcí a byla zjištěna přítomnost příměsí, která nebyla oddělitelná pomocí RP-HPLC. Další peptidy jsou postupně izolovány a analyzovány z hlediska antimikrobiálních vlastností.

Dále jsme izolovali RNA z celých larev a z hemocytů indukovaných i neindukovaných larev. Metodou q-PCR jsme sledovali změny exprese identifikovaných antimikrobiálně aktivních frakcí u indukovaných a neindukovaných larev. 2D-elektroforézy jsme využili k porovnání proteomu indukovaných a neindukovaných larev a ke zjištění proteinů, které se mohou podílet na imunitní odpovědi *Neobellieria bullata*.

Tato práce je podporována grantem GA ČR 203/05/0832, FRVŠ grantem 315/2005 a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

LITERATURA

1. McPhee J.B., Hancock R. E. W.: *J. Pept.Sci.* 11, 677 (2005).

KLONOVÁNÍ A PURIFIKACE CATHEPSINU B2 Z CERKÁRIÍ PTAČÍ SCHISTOSOMY *TRICHOILHARZIA REGENTI*

KATEŘINA DOLEČKOVÁ^a, LIBOR MIKEŠ^a, PETR HORÁK^a a ADRIAN MOUNTFORD^b

^aKatedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 7, 128 44 Praha, ^bThe University of York, Department of Biology (Area 5), YO10 5YW York, UK.
k.doleckova@centrum.cz

Trichobilharzia regenti, parazitická motolice vodních ptáků z čeledi Schistosomatidae, má neobvyklou životní strategii. Na rozdíl od běžných schistosom, které využívají k migraci krevní řečiště, vyhledává *T. regenti* po proniknutí kůží periferní nervový systém a postupuje dál míchou a mozem, až do nosní dutiny definitivního hostitele, kde dospělci kladou vejce. Migrace způsobuje degradaci tkání a neuro-motorické poruchy jak u specifických (vodní ptáci), tak u nespecifických hostitelů (experimentálně nakažené myši).

Do kůže definitivního hostitele se invazní larvy (cerkárie) dostávají díky aktivní penetraci. K tomu jim slouží penetrační žlázy, jejichž obsah začnou cercárie po kontaktu s kůží hostitele vyprazdňovat. Exkrečně sekreční produkty žláz obsahují řadu látek, např. proteasy serinového a cysteinového typu, lektiny, vápník, eikosanoidy, calreticulin, mukopolysacharidy apod.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium proteas. Tyto enzymy umožňují parazitům pronikat do hostitelských tkání a trávit je, unikat imunitní odpovědi hostitele nebo naopak hostitelskou imunitu stimulovat. Ze studia na lidských schistosomách vyplynulo, že právě proteasy by se mohly stát slibnými serodiagnostickými markery nebo potenciálními cíli pro vývoj nových chemoterapeutik.

Na základě sekvenčních homologií aktivních konzervovaných míst cathepsinů B známých u lidských schistosom byly vytvořeny degenerované primery a provedena PCR. Byl získán DNA fragment o délce cca 600 bp. Po porovnání s databází DNA sekvencí BLAST byl rozpoznán jako částečná nukleotidová sekvence pro cathepsin B, pracovním názvem označený jako TrCB2.

Využitím sekvenčně specifických primerů byla provedena 5' a 3' amplifikace konců (RACE) pro získání celého genu. Takto získaný gen (1032 bp ~ 344 aminokyselin) vykazoval největší homologii s cathepsiny B2 z lidských schistosom (81,1 % s SJC2 ze *S. japonicum* a 79,9 % s SmCB2 ze *S. mansoni*).

Úplná sekvence TrCB2 byla poté upravena pro klonování do expresního systému methylotrofni kvasinky *Pichia pastoris* a úspěšně exprimována. Identita exprimovaného proteinu byla potvrzena pomocí MALDI MS/MS spektrometrie. Hladina exprese byla sledována u pěti klonů, z nichž se jako nejvíce produktivní ukázal klon TrCB2-4, jehož exprimovaný protein – cathepsin B2 byl následně purifikován v několika krocích. Po zahuštění centrifugací a odsolení média s exprimovaným proteinem pomocí dialýzy byl finálně cathepsin B2 přečištěn na FPLC katexové koloně.

Získaný rekombinantní enzym bude využit k přípravě monospecifických myších a kachních protilátek a pro funkční a biochemickou charakterizaci peptidasy.

IZOLACE A CHARAKTERIZACE LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍMI ÚČINKY Z PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

IVANA DOLEŽÍLKOVÁ^a, MARTINA MACKOVÁ^a, TOMÁŠ MACEK^b a TEREZA NEUBAEROVÁ^a

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

Důsledkem toho, že rostliny jsou častým cílem různých patogenních organismů, vyvinul se u nich účinný obranný systém, který má buď zabránit či eliminovat poškození způsobená např. viry, bakteriemi, houbami nebo hmyzem. V první řadě jsou to látky proteinové a peptidové povahy:

lectiny, proteiny inaktivující ribosomy, chitinasy, proteasy, defensiny, peroxidasy, peptidy na bázi ubiquitinu, ribonukleasy a peptidy s vysokým obsahem argininu a glutamátu. Další skupiny tvoří vedle látek organické povahy, zahrnující sloučeniny fenolické, nenasycené laktony, saponiny a dieny, rovněž dusíkaté látky a peroxid vodíku¹. Během posledních 15 let byla v mnoha rostlinách identifikována řada proteinů a peptidů s antimikrobiálními účinky. Antimikrobiální peptidy představují různorodou skupinu nízkomolekulárních sloučenin s různou sekvencí, délkou a strukturou. Vykazují aktivitu vůči širokému spektru mikroorganismů zahrnující G⁺ a G⁻ bakterie, protozoa, kvasinky, plísňe a viry. U některých peptidů byl pozorován také inhibiční účinek na nádorové buňky. Proto se antimikrobiální peptidy považují za ideální kandidáty pro vývoj nových léků proti obtížně léčitelným infekcím a několik málo zástupců bylo účinných rovněž proti patogenům způsobující sexuální přenosné infekce včetně HIV/HSV².

Tato práce je zaměřena na izolaci a charakterizaci látek, především pak krátkých peptidů s antimikrobiálním a antifungálním účinkem z rostlinného materiálu. Některé z látek jsou indukovány specifickými biotickými nebo abiotickými faktory, jiné jsou vytvářeny konstitutivně. Rozličné typy antimikrobiálních látek byly získány z hmyzu, z různých částí rostlin (semen, listů, kořenů a květů) nebo mezibuněčných tekutin. Antimikrobiální peptidy byly izolovány v několika krocích srážením bílkovinných frakcí a reverzní HPLC a charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami: UV-VIS spektroskopii, SDS-PAGE elektroforézou a hmotnostní spektrometrií. Byla testována antibakteriální a antifungální aktivita s cílem prokázat účinnost a vhodnou koncentraci. Jako testovací modely byly použity patogenní a potenciálně patogenní bakterie: G⁻: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium rhizogenes*; G⁺: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter ureafaciens*. V případě testování antifungální aktivity byly použity plísňe: *Fusarium culmorum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus terreus* a *Alternaria sp.* Metodicky byly použity rychlá screeningová metoda na agaru a metoda využívající přístroj Bioscreen, kde je monitorován růst bakterií v závislosti na době inkubace. Z rostlinného materiálu se podařilo izolovat frakci z listů *Nicotiana tabacum*, která působila inhibičně na houby *Cladosporium herbarum* a *Alternaria sp.*

Autoři děkují grantové podpoře GA ČR 203/05/0832.

LITERATURA

1. Wong J. H., Ng T. B.: Peptides 26, 1120 (2005).
2. Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: Int. J. Antimicrob. Agents 24, 536 (2004).

THE ENVIRONMENTAL POLLUTANT 3-NITROBENZANTHRONE AND ITS HUMAN METABOLITE 3-AMINO BENZANTHRONE INDUCE THEIR ACTIVATING ENZYMES IN RATS

HELENA DRAČÍNSKÁ^a, VOLKER M. ARLT^b,
and MARIE STIBOROVÁ^a

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, 12843 Prague 2, Czech Republic; ^bSection of Molecular Carcinogenesis, Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom; helili@centrum.cz

The suspected human carcinogen 3-nitrobenzanthrone (3-NBA) is one of the most mutagenic nitroaromatic compounds identified in diesel exhaust and airborne particulate matter. A major metabolite of 3-NBA, 3-aminobenzanthrone (3-ABA), was detected in the urine of salt mining workers occupationally exposed to diesel emissions.¹ Both 3-NBA and 3-ABA were investigated for their ability to induce biotransformation enzymes in rat liver and for the influence of such induction on formation of DNA adduct by these compounds. Rats were treated intraperitoneally with 0.4, 4 or 40 mg/kg body weight of 3-NBA or 3-ABA. When hepatic cytosolic fractions from rats treated with 40 mg/kg body weight of 3-NBA or 3-ABA were incubated with 3-NBA, DNA adduct formation, measured by 32P-postlabelling analysis, was 10-fold higher than in incubations with cytosols of control rats. The increase in 3-NBA-derived DNA adduct formation corresponded with a dose-dependent increase in protein expression and enzymatic activity of the major phase I enzyme activating 3-NBA in human and rat livers, NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1).² Incubations of 3-ABA with hepatic microsomes of rats treated with 3-NBA or 3-ABA (40 mg/kg body weight) led to an up to 12-fold increase in 3-ABA-derived DNA adduct formation compared to controls. This observed stimulation of DNA adduct formation by both compounds was attributed to their potential to induce protein expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and/or -1A2 (CYP1A1/2), the major enzymes responsible for 3-ABA activation in human and rat livers.³ In addition, experiments on modulation of mRNA expression by the studied compounds, analyzed by real-time PCR, showed the increased mRNA expression of hepatic CYP1A1 and NQO1 after treatment of rats with 40 mg 3-NBA/kg body weight. Collectively, these results demonstrate for the first time that by induction of hepatic NQO1 and CYP1A1/2, both 3-NBA and 3-ABA increase their enzymatic activation to reactive DNA adduct forming species, thereby enhancing their own genotoxic potential.

This work was supported by Grant Agency of Czech Republic (grant 303/05/2195).

REFERENCES

1. Arlt V. M.: Mutagenesis 20, 399 (2005).
2. Arlt V. M., Stiborová M., Henderson C. J., Osborne M. R., Bieler C. A., Frei E., Martínek V., Sopko B., Wolf C. R., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: Cancer Res. 65, 2644 (2005).
3. Arlt V. M., Hewer A., Sorg B. L., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Stiborová M.: Chem. Res. Toxicol. 17, 1092 (2004).

PŘÍSPĚVEK KE STUDIU MECHANISMU ÚČINKU PROTINÁDOROVÉHO LÉČIVA ELIPTICINU

MARTIN DRAČÍNSKÝ^a, JAN SEJBAL^a a OBIS CASTAÑO^b

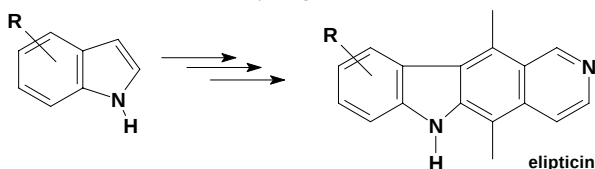
^aKatedra organické chemie PřF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2; ^bDepartamento de química física, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Španělsko
martindraca@yahoo.com

Elipticin a jeho deriváty (zejména 9-hydroxyderiváty) jsou protinádorová léčiva¹. Dosud není znám mechanismus jejich působení, silná vazba na DNA (zejména interkalace) je však nutnou podmínkou jejich účinku². V této práci byla studována syntéza elipticinu a jeho interakce s DNA pomocí teoretických výpočtů a pomocí NMR experimentů.

Syntéza elipticinu a jeho derivátů vycházela z vhodně substituovaného indolu. V pěti reakčních krocích byl získán čistý elipticin v celkovém výtěžku 12 %. Během celé reakční sekvence nebylo nutné použít chromatografické čištění. Díky syntéze některých derivátů elipticinu se podařilo ověřit strukturu produktů metabolismu elipticinu.

Výpočetní chemie je v poslední době stále oblíbenější metoda pro studium chování biomolekul a jejich interakcí s ligandy. Velmi rozšířené jsou takzvané empirické potenciály (silová pole), které jsou součástí programů pro molekulové modelování (AMBER, HyperChem, ...) a jsou používány i pro studium interkalace do DNA. V této práci byly výsledky získané pomocí empirických potenciálů porovnávány s výpočty *ab initio* a bylo zjištěno, že empirické potenciály jsou vhodné pro odhad interakčních energií mezi interkalátory a bázemi DNA, ale nejsou schopny správně zjistit vzájemné prostorové uspořádání v těchto komplexech.

Jinou možností, jak studovat interakce biomakromolekul, například DNA a proteinů, s malými molekulami (ligandy) je NMR spektroskopie³. Použití technik NOESY umožňuje zjištění třidimenzionální struktury molekul v roztoku za fyziologických podmínek (pH, iontová síla)^{4,5}. V této práci byly studovány interakce derivátů elipticinu s duplexy oligonukleotidů. Roztoky oligonukleotidů byly titrovány elipticinem a byly sledovány změny ¹H NMR spekter způsobené přidávkou interkalátoru. Bylo zjištěno, že elipticin tvoří s oligonukleotidy komplexy, jejichž střední doba života se pohybuje v řádu milisekund, geometrie komplexů odpovídá interkalaci. Elipticin také mění stabilitu dvoušroubovicové struktury oligonukleotidů.



LITERATURA

1. Fosse P., Rene B., Charra M., Paoletti C., Savcier J.M.: Mol. Pharm. 42, 590 (1992).
2. Auclair C.: Arch. Biochem. Biophys. 259, 1(1987).

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

ROLE OF MICROTUBULES NETWORK IN AhR-DEPENDENT CYP1A1 EXPRESSION IN HepG2 CELLS AND PRIMARY RAT HEPATOCYTES

ZDENĚK DVOŘÁK, RADIM VRZAL, and MARTIN MODRIANSKÝ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Cytochrome P450 (CYP) 1A1 is responsible for production of carcinogenic reactive metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons such as benzo[a]pyrene but recent developments indicate its apparent role in cell cycle progression. Expression of CYP1A1 is subject to regulation by aryl hydrocarbon receptor (AhR). We show that induction of CYP1A1 in HepG2 cells and primary rat hepatocytes by tetrachloro-*p*-dibenzodioxin (TCDD) is restricted by colchicine and nocodazole. Both compounds decrease CYP1A1 mRNA, protein, and activity levels in HepG2 cells and mRNA level in primary rat hepatocytes. Neither compound significantly affected [3H]-TCDD binding to AhR, thus their effect on AhR transcriptional activity proceeds via indirect means. For colchicine and nocodazole, well-known microtubule interfering agents, we also assessed their effects on microtubules integrity in both cell types under investigation. Colchicine and nocodazole disrupt cytoskeleton integrity with differential potency depending on cell type. The observed inhibition of AhR transcriptional activity by colchicine and nocodazole can be associated with G2/M cell cycle arrest in HepG2 cells, as demonstrated by Myt1 protein hyperphosphorylation and FACS analysis. However, in primary rat hepatocytes cytoskeleton disruption is independent of cell cycle while displaying the same influence on AhR-dependent gene transcription. In our view, this is evidence in favor of modulatory role of cytoskeleton in AhR-dependent expression¹.

This research was supported by grant MSM 6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by grant GACR 303/04/P074 from the Grant Agency of the Czech Republic.

LITERATURA

1. Dvořák Z., Vrzal R., Ulrichová J., Pascucci J.M., Maurel P., Modrianský M.: Curr. Drug Metab. in press (2006).

BIOTRANSFORMACE MONOTERPENICKÝCH SMĚSÍ POMOCÍ *IN VITRO* KULTURY *PICEA ABIES*

MARCELA DVOŘÁKOVÁ^a, IRENA VALTEROVÁ^b
a TOMÁŠ VANĚK^b

^a Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, Praha 2;

^b Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, Praha 6

Biotransformace monoterpenů je ekologicky šetrná metoda používaná k přípravě produktů, které se často využívají v potravinářství či parfumerii. Často nahrazuje klasickou organickou syntézu, neboť s její pomocí lze snadněji dosáhnout stereo- i regiospecifických produktů a navíc lze tyto produkty považovat za produkty přírodní, které jsou v daných průmyslových odvětvích velmi žádané.

Naše studie se zabývá biotransformací monoterpenní směsi, terpentýnu, pomocí *in vitro* kultury *P. abies*. Cílem práce byla identifikace produktů biotransformace a vyhodnocení závislosti relativního zastoupení produktů ve směsi v průběhu biotransformace pro různé výchozí koncentrace terpentýnu.

Bylo zjištěno, že hlavní produkty biotransformace terpentýnu odpovídají produktům biotransformace jeho jednotlivých složek^{1,2} (viz Schéma 1). Terpentýn je tedy možné použít pro biotransformaci směsi monoterpenů bez jejího předchozího dělení na jednotlivé složky a zároveň získat řadu cenných produktů v jediném biotransformačním kroku.

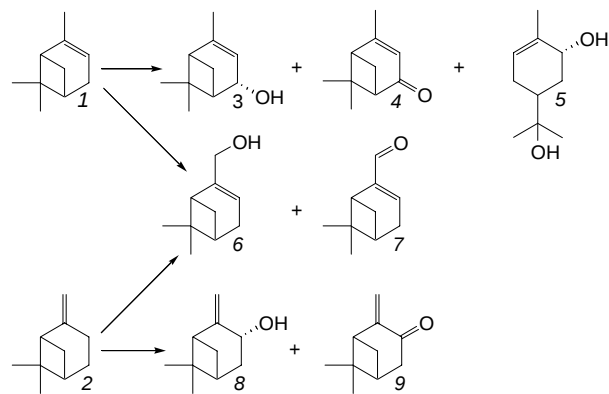


Schéma 1: Hlavní složky terpentýnu: α-pinen (1), β-pinen (2), a hlavní produkty jeho biotransformace: *trans*-verbenol (3), verbenon (4), *trans*-sobrerol (5), myrtenol (6), myrtenal (7), *trans*-pinokarveol (8), pinokarvon (9)

Studie byla podporována projektem COST 926.10

LITERATURA

1. Lindmark-Henriksson M., Isaksson D., Sjödin K., Högberg H.-E., Vaněk T., Valterová I.: J. Nat. Prod. 66, 337 (2003).

2. Lindmark-Henriksson M., Isaksson D., Vaněk T., Valterová I., Högberg H.-E., Sjödin K.: J. Biotechnol. 107, 173 (2004).

CtBP-1/ BARS-50 INTERACTS DIRECTLY WITH BASSOON AND PICCOLO, WHICH ARE ESSENTIAL FOR ITS SYNAPTIC RECRUITMENT

ANNA FEJTOVA^a, WILKO D. ALTROCK^a, BRITTA QUALMANN^a, MICHAEL KESSELS^a, SUSANNE TOM DIECK, STEFAN H. GERBER^a, THOMAS C. SÜDHOF^a, and ECKART D. GUNDELINGER^a

^aLeibniz Institute for Neurobiology, Magdeburg, Germany,

^bDepartment of Cardiology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; ^cHoward Hughes Medical Institute, The Center for Basic Neuroscience and Department of Molecular Genetics, UT SW medical Center, Dallas, TX 75390, USA

Neurotransmitter release is restricted to a specialized region of the presynaptic plasma membrane – the active zone. The cytoskeletal matrix at the active zone (CAZ) is thought to play a fundamental role in the organization of synaptic vesicle cycle, the definition of neurotransmitter release sites and their precise alignment with the postsynaptic neuroreception apparatus. Bassoon (Bsn) and Piccolo (Pclo) are related CAZ-specific proteins. They are thought to act as scaffolding proteins that organize components of the exocytic and endocytic machineries at the active zone. In a yeast-two-hybrid screen for potential binding partners, we observed a direct interaction of Bsn with the C-terminal binding protein 1/Brefeldin A-ADP-ribosylation substrate of 50 kDa (CtBP1/ BARS-50). CtBP1/BARS-50 was independently identified as a nuclear transcriptional co-repressor regulating several transcription factors, and in addition as a cytoplasmic, Golgi-associated protein involved in the Golgi structure maintenance and in the membrane transport processes. Although the binding site of CtBP-1/BARS-50 is located outside of the characterized Bsn/Pclo homology domains, we could also confirm its binding to Pclo. CtBP-1/BARS-50 is expressed in mammalian brain and co-localizes with Bsn and Pclo in young and mature cultured hippocampal neurons. To assess the role of Bsn and Pclo in synaptic targeting of CtBP-1/BARS-50 we used hippocampal primary cultures from mice lacking either Bsn or Pclo or both. Whereas the synaptic localization of CtBP-1/BARS-50 is normal in neurons from single mutant animals, it is completely disrupted in neurons lacking both genes. The synaptic targeting of CtBP-1/BARS-50 can be restored by expression of GFP-tagged Bsn. Mice lacking either Bsn or Pclo are viable while double mutants die within few hours after birth. This suggests a partially redundant function of Pclo and Bsn including the recruitment of common interaction partners to the CAZ. CtBP-1/BARS-50 is the first example of this type of proteins and a detailed analysis of its function may help to understand the serious phenotype of double mutant mice and in turn the molecular functions of Bsn and Pclo.

Supported by the DFG; A.F. was recipient of a fellowship from the Swiss National Foundation.

ANALÝZA STRUKTURNÍCH A FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ TEPLOTNĚ ZÁVISLÝCH MUTANTŮ p53 V KVASINKÁCH

DIANA GROCHOVÁ^a, JANA VAŇKOVÁ^b, BARBORA RAVČUKOVÁ^b, MILUŠKA SVITÁKOVÁ^a a JANA ŠMARDOVÁ^a

^aÚstav patologie, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno;

^bOddělení lékařské genetiky, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno
diana.groch@gmail.com

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který zajišťuje odpověď buňky na buněčný stres a poškození DNA tím, že aktivuje expresi řady cílových genů. Výsledkem této aktivace je ovlivnění regulace důležitých buněčných procesů jako je apoptóza nebo zástava buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že u více než poloviny všech lidských nádorů se nachází mutace v genu p53. Většina těchto mutací se vyskytuje v DNA vazebné doméně proteinu p53 a ovlivňuje tak jeho sekvenčně specifickou DNA vazebnou aktivitu.

Pro analýzu statutu p53 v nádorové tkáni se využívá řada technik, mezi něž patří funkční analýza separovaných alel v kvasinkách FASAY (*functional analysis of separated alleles in yeast*). Je to citlivá, semikvantitativní metoda, která na základě zbarvení kvasinkových kolonií exprimujících lidský protein p53 rozeznává kolonie obsahující funkční protein p53 (bílé kolonie) od kolonií s nefunkční formou proteinu p53 (červené kolonie). Tato metoda také umožňuje rozeznat mutace, které vedou pouze k částečné inaktivaci proteinu p53, např. teplotně senzitivní mutace (růžové kolonie).

Pomocí metody FASAY jsme analyzovali status proteinu p53 u různých typů nádorů. Identifikovali jsme 22 různých teplotně závislých mutací, kde většina z nich (91%) spadá do DNA vazebné domény proteinu p53. U těchto 22 teplotně-závislých p53 mutantů jsme dále analyzovali jejich funkční vlastnosti: na základě zbarvení kvasinkových kolonií jsme studovali transaktivační schopnosti jednotlivých mutantů p53 ve vztahu k teplotě kultivace a k sekvenci různých responzivních elementů. Zjistili jsme, že jednotliví teplotně závislí p53 mutanté se liší mírou své teplotní závislosti, tj. liší se teplotou, při které dochází k plnému nebo alespoň částečnému obnovení jejich transaktivační schopnosti. Většina teplotně závislých mutantů se také liší mírou své aktivity na různých typech promotorů, mají takzvaně diskriminující povahu.

Pro studium konformačních vlastností jednotlivých p53 mutantů jsme využili konformačně specifických protilátek PAb1620 a PAb240 (v lidských buňkách preferenčně rozeznávají standardní - nedenaturovanou respektive mutantní - denaturovanou formu proteinu p53). Provedli jsme imunoprecipitaci proteinu p53 exprimovaného v kva-

sinkách při třech různých teplotách a dále jsme ověřovali, zda metoda FASAY může být využita při testování schopnosti radio- a chemoprotektivní látky Amifostin reaktivovat transkripční funkci mutantů p53.

Detailnější analýza funkčních a strukturních vlastností mutantů p53 a jejich podrobná stratifikace mohou být užitečné pro lepší pochopení účinků specifických mutantů na procesy vedoucí k transformaci nádorové buňky a také při navrhování potenciálních terapeutik obnovujících funkci proteinu p53.

Tato práce je podporována grantem NR/8068-3 IGA MZ ČR.

NUKLEOFILNÍ ADICE NA PROTOBERBERINOVÝ A BENZOFENANTHRIDINOVÝ SKELET

LENKA GRÝCOVÁ, DAGMAR HULOVÁ, STANISLAV STANDARA a RADEK MAREK*

Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita; ILBIT-A4, Kamenice 5,

625 00 Brno

baracek@chemi.muni.cz, rmarek@chemi.muni.cz

Kvarterní protoberberinové (KPA) a benzo[c]fenanthridinové (KBA) alkaloidy patří mezi isochinolinové alkaloidy a jsou součástí velké skupiny sekundárních metabolitů. KPA se vyznačují značnou biologickou aktivitou. Interagují s nukleovými kyselinami a proteiny, vykazují řadu účinků na organismus, např. antibakteriální, antimalarické nebo cytotoxické.

Základem KPA je 5,6-dihydrobenzo[a,g]chinoliniový systém (I) s modifikacemi nejčastěji v polohách 2,3,9 a 10 a KBA 5-methylbenzo[c]fenanthridiniový systém (III) se substitucí v polohách 2,3,7 a 8. KPA i KBA jsou charakteristické polární iminiovou skupinou C=N⁺ a její citlivostí na nukleofilní atak. V takovém případě dochází ke vzniku 8- (II) resp. 6- (IV) substituovaných derivátů (viz Schéma 1 a 2).

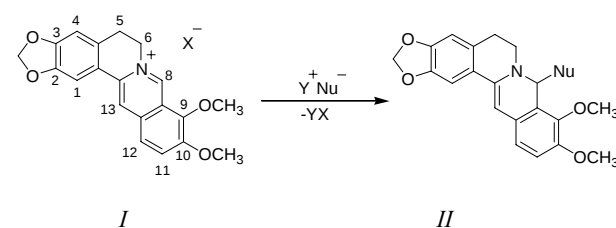


Schéma 1

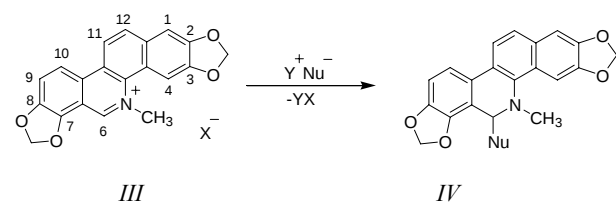


Schéma 2

Studium reakce isochinolinových alkaloidů s dusíkatými nukleofily napomáhá lepšímu porozumění interakce alkaloidu s dusíkatouází nukleových kyselin.

Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR 525/04/0017.

LITERATURA

1. Shamma M.: *The isoquinoline alkaloids*, Academic press, New York, London 1972.
2. Marek R., Sečkářová P., Hulová D., Marek J., Dostál J., Sklenář V.: J. Nat. Prod. 66, 481 (2003).

VYUŽITÍ AXIÁLNĚ CHIRÁLNÍCH KARBAMÁTŮ A KARBONÁTŮ PRO STANOVENÍ ABSOLUTNÍ KONFIGURACE AMINŮ A ALKOHOLŮ METODOU ^1H NMR

PETR HARTVICH^a a LUDVÍK STREINZ^b

^aBiologické centrum Akademie věd ČR, Entomologický ústav, Laboratoř analytické biochemie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^bÚstav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Oddělení přírodních látek, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 hartvich@entu.cas.cz

Byl syntetizován soubor axiálně chirálních chloroformiátů (derivátů 1,1'-bi(2-naftolu)), ze kterých následně byl reakcí s chirálními aminy připraven set diastereoisomerních karbamátů, jež byly dále studovány metodou ^1H NMR. Podobně byl připraven reakcí chloroformiátů s alkoholy set diastereoisomerních karbonátů. Byla zjištěna jednoznačná korelace mezi navrženým prostorovým modelem (podpořeným výpočty *in silico*) a naměřenými rozdíly chemických posunů diastereoisomerních derivátů v ^1H NMR spektrech. Dalším vynikajícím výsledkem je hodnota Δppm studovaných funkčních skupin pohybujících se běžně mezi 0,1–0,4 ppm, naměřené maximum je $\Delta\text{ppm} = 0,72$. K jednoznačné interpretaci výsledků výrazně přispívá značná konformační rigidita derivátů. Hlavní výhody nové metody proti zavedeným činidlům (např. Mosherova kyselina) jsou zejména: mimořádné rozdíly chemických posunů a jednoznačná predikce spektrálního chování studovaného derivátu, stejně jako vynikající reaktivita a dobrá syntetická a ekonomická přístupnost obou enantiomerů činidel.

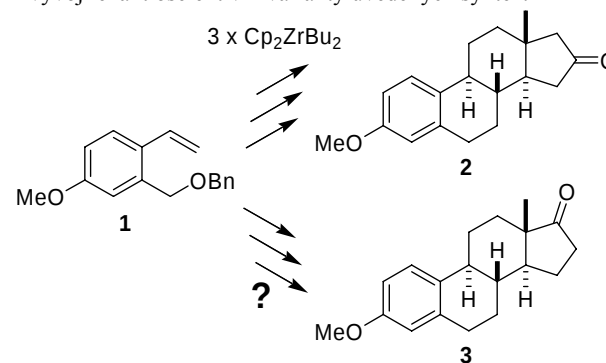
MODULÁRNÍ SYNTÉZA STEROIDŮ S AROMATICKÝM A-KRUHEM

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

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bPřírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 43 Praha 2 herrmann@uochb.cas.cz

Cílem projektu je vyvinout jednoduchou a jednotnou syntetickou metodiku pro přípravu polycyklických přírodních sloučenin (isoprenoidů). Naše strategie je založena na opakovaném použití jednoho činidla za různých reakčních podmínek. Tímto činidlem je dibutylzirkonocen (Negishiho činidlo), který reaguje s různými substráty za vzniku stabilních organozirkoničitých sloučenin, které mohou být dále využity k tvorbě C-C vazeb^{1–4}.

Schůdnost této strategie byla demonstrována na syntéze derivátů estronu. Například steroid **2**, ($\pm$)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-16-on, byl připraven ve třech krocích ze snadno dostupného styrenu **1**. Každý krok je založen na použití Negishiho činidla za vzniku organozirkoničité sloučeniny. Tyto meziprodukty jsou následně „*in situ*“ transmetalovány katalytickým množstvím CuCl na organomědné sloučeniny, které pak reagují s různými elektrofilů. Ve výsledku pak dochází k postupné výstavbě celého steroidního skeletu. Dále budou diskutovány syntetické aspekty celé syntézy a jejich možnosti a limity aplikace pro přípravu ($\pm$)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-onu **3**. V neposlední řadě budou uvedeny výsledky směřující k vývoji enantioselektivní varianty uvedených syntéz.



Projekt byl financován z Centra pro nová antivirotika a anti-neoplastika MŠMT (Projekt č. 1M6138896301) a grantem 322/2005/B-CH/PrF GAUK.

LITERATURA

1. Negishi E., v: *Comprehensive Organic Synthesis*, Eds. Trost B. M., Paquette L. A., Vol. 5, p. 1163. Pergamon, 1991.
2. Takahashi T., Kotora M., Kasai K.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994, 2693.
3. *Titanium and Zirconium in Organic Synthesis*, Ed. Marek, I.; Wiley-VCH, Weinheim 2002.
4. Ikeuchi Y., Taguchi T., Hanzawa Y. J. Org. Chem. 70, 756 (2005).

SINGLE HEPTAHELICAL DOMAIN IS TURNED ON UPON ACTIVATION OF A DIMERIC METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS

VERONIKA HLAVACKOVA, LAURENT PREZEAU, JEAN-PHILIPPE PIN, and JAROSLAV BLAHOS

Department of Molecular Pharmacology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic and Department of Molecular Pharmacology, Laboratory of Functional Genomic, CNRS unite propre de Recherche 2580, Montpellier, France

The metabotropic glutamate (mGlu) receptors are G-protein-coupled receptors (GPCRs) that exist and function as homodimers composed of two identical subunits covalently bound in the extracellular domain. The relevance of dimerization of these receptors in respect to activation of the transmembrane heptahelical domain (HD) of each subunit upon full receptor activation is of particular interest. We constructed several chimerical receptors in which quality control of GABA_B receptor heterodimerization and cell-surface expression was used. This allowed us to measure G-protein coupling efficacy of dimeric mGlu receptors in which only one subunit bears specific mutations. Single mutation in the third intracellular loop is known to fully prevent G-protein activation when present in both subunits. We show, that when present only in a single subunit per dimer, this mutation decreases coupling efficacy. In contrast when a single HD has engineered binding site for allosteric inhibitor and is blocked in its inactive state by such compound, no decrease in receptor activity is observed. In a receptor dimer in which the same subunit binds the negative modulator and is also mutated in its i3 loop, the compound enhances agonist-induced activity. We propose, that this phenomenon reflects a 'better' activation of the adjacent HD. Our data are in agreement with a model in which a single HD is turned on upon activation of homodimeric receptors. Complementary with these results are data obtained using positive allosteric modulators in experiments with similar settings. Here the most interesting finding is that occupation of a single HD is enough for full enhancement effect.

Situation of asymmetric functioning of mGlu receptors corresponds to findings on GABA_B receptor activation process.

This work was supported by: Grant Agency of Czech Republic (301/03/1183, 301/03/H095, 204/05/0920), Grant Agency of Czech Academy of Science (KJB5039402), AVOZ50390512.

DIFFERENCES IN CELL CYCLE REGULATION AFTER PLATINUM DERIVATIVES TREATMENT IN SENSITIVE AND CISPLATIN RESISTANT OVARIAN CANCER CELL LINES

VIKTOR HORVÁTH^a, KAREL SOUČEK^a, LENKA ŠVIHÁLKOVÁ-ŠINDLEROVÁ^a, JIŘINA HOFMANOVÁ^a, PETR SOVA^b, and ALOIS KOZUBÍK^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno; ^bPLIVA-Lachema a.s., Karásek 1, 621 33 Brno
horvath@ibp.cz

Cisplatin is one of the most potent antitumour agents which display high efficiency in the treatment of ovarian cancer. However, cisplatin is active in a limited range of cancer types, and its effects are often decreased due to intrinsic or acquired resistance. LA-12 (currently under the 1st phase of clinical evaluation) is a novel octahedral platinum(IV) complex containing a bulky hydrophobic ligand – adamantylamine. In our previous studies^{1,2} we showed that LA-12 was able to overcome both the acquired and the intrinsic cisplatin resistance. In addition, we investigated the effects of LA-12 on cytokinetic parameters of ovarian cancer cell lines with different sensitivity to cisplatin - A2780 (cisplatin sensitive), A2780cis (with acquired cisplatin resistance) and SK-OV-3 (with intrinsic resistance to cisplatin), and compared them with the effects caused by cisplatin. Interestingly, we found the differences in cell cycle perturbation after 24 h cisplatin or LA-12 sustained treatment. Activation of cell cycle checkpoints is a general cellular response after exposure to cytotoxic agents. Therefore we characterize in more detail several signal transduction pathways that are activated in response to exposure to the DNA damage-inducing agents such as studied platinum-based compounds.

Exposure to LA-12 resulted in accumulation of A2780 and A2780cis cells in S phase, while cisplatin caused G2/M arrest in sensitive and S phase arrest in resistant cells after 24 h of treatment. Detailed simultaneous flow cytometric analysis of cell cycle distribution and DNA synthesis revealed that cisplatin in A2780 cells primarily caused transient S-phase arrest as LA-12, but this arrest was shifted to G2/M at later time points (24 h). Moreover, at 24 h we detected decreased cdk-2-associated kinase activity using *in vitro* kinase assay. Western blot analysis indicated a concentration-dependent accumulation of p53 protein which is implicated modulation of cell cycle, as the result of cellular response to DNA damage. Equitoxic LA-12 (IC₅₀) and cisplatin (IC₅₀) concentrations increased p53 protein levels already after 6 h of treatment followed by increasing of p21^{waf1} levels at 12-24 h time points in studied cell lines, both significantly higher after cisplatin treatment. In the present study, we expanded our investigations to examine the effects of equitoxic concentrations of LA-12 or cisplatin in A2780 and A2780cis cells on the protein expression of either p53-targeted genes that have been shown to be important in the cellular response to DNA damage including Bax, Gadd45, Mdm2 or cell cycle regulatory genes such as Cyclin A, Cyclin B1 or cdk-2.

Supported by the IGA grant No. 1QS500040507 of the Academy of Sciences of the Czech Republic and by the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, Contract No. PZ-Z2/29, "New Medicines for Cancer Therapy"

REFERENCES

1. Horváth V., Blanářová O., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Fedorčko P., Kozubík A.: Gynecologic Oncology, in press (2006).

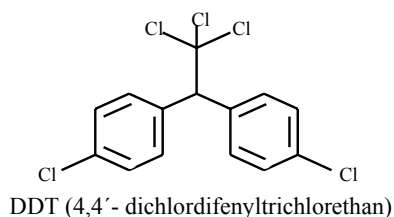
2. Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Žák F., Mistr A., Turánek J.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 373 (2005)

VÝVOJ ENZYMOVÉHO BIOSENZORU PRO DETEKCI CHLOROVANÝCH PESTICIDŮ

JAN HRADECKÝ^a, RADKA MIKLOVÁ^b, ZBYNĚK PROKOP^c, LIBUŠE TRNKOVÁ^b, JIŘÍ DAMBORSKÝ^c, VOJTĚCH ADAM^{a,d} a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ^bKatedra teoretické a fyzikální chemie, a ^dKatedra analytické chemie P5F MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cLoschmidtovy laboratoře Kamenice 5/4A, 625 00 Brno
univerzita.janhradecky@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

Chlorované pesticidy, jako například deriváty DDT, hexachlorbenzenu a řada dalších byly velmi hojně užívány v ochraně rostlin. Je známo, že rezidua těchto pesticidů se v živočišném i lidském organismu ukládají do tukové tkáně, a z ní mohou přecházet do vajec ptáků nebo mateřského mléka savců. Navíc ve větších koncentracích pak mohou způsobovat nádorová onemocnění či neplodnost. Základní rozdělení pesticidů je určeno podle cílové skupiny organismů. Dále členíme pesticidy podle obsahu jedné či více účinných látek. Z chemického hlediska účinná látka může být jak anorganického, tak organického původu. Používání anorganických pesticidů se omezuje, protože kontaminují životní prostředí. Avšak organické pesticidy jsou stále velmi hojně využívány v ochraně rostlin. Jsou to většinou organofosforové, organochlorové a karbamátové sloučeniny. Působí velmi intenzivně na celý organismus a většinou dlouhodobě.



Proto je potřebné vyvíjet jednoduché a přesné nástroje k detekci takových chemických sloučenin^{1,2}. Námi navržený senzor je založený na detekci chloridů na uhlíkové pastové elektrodě anebo elektrodě ze skelného uhlíku, jak ve stacionárním, tak průtokovém systému. V prostředí je koncentrace chlorovaných uhlovodíků velmi nízká, nižší než jsme efektivně schopni změřit na samostatné uhlíkové elektrodě (10^{-6} M). Pro dosažení lepší senzitivity a selektivity bylo možné uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovat přidáním dusičnanu stříbrného. Modifikaci elektrody byl limit detekce chloridů snížen až na koncentraci 10^{-8} M. Takto vytvořenou metodu bylo nutné převést do praxe a navrhnout biosenzor. Toho jsme mohli dosáhnout díky další modifikaci uhlíkové elektrody, tentokrát enzymem dehalogenasou

bakterie *Pseudomonas paucimobilis*. Dehalogenasy byly popsány jako enzymy schopné odštěpovat z halogenovaných uhlovodíků právě halogen. Takto uvolněný halogen je možné analyzovat námi vypracovanou elektroanalytickou metodikou. Sledovali jsme štěpení modelového chlorovaného uhlovodíku (1-chlorhexan). Na základě našich výsledků bylo možné dehalogenasy využít pro navrzení nového biosenzoru k detekci chlorovaných pesticidů³.

Práce na tomto projektu byla podporována grantem: GAČR 525/04/P132.

LITERATURA

1. Kizek R., Masarik M., Kramer K. J., Potesil D., Bailey M., Howard J. A., Klejdus B., Mikelova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1167 (2005).
2. Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* 75, 2663 (2003).
3. Hradecky J., Mikelova R., Prokop Z., Trnkova L., Damborsky J., Adam V., Petrlouva J., Kizek R.: *MendelNet05 Agro*, 61 (2005).

NESYMETRICKY SUBSTITUOVANÉ BIPYRIDIN-*N,N*-DIOXIDY V ORGANOKATALÝZE

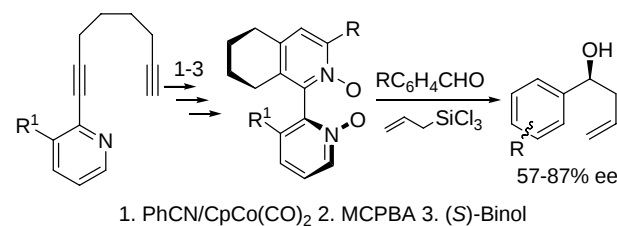
RADIM HRDINA^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
radimhrdina@email.cz, kotora@natur.cuni.cz

Homogenní enantioselektivní katalýza směřuje v posledních letech k používání katalytických systémů neobsahujících sloučeniny přechodných kovů. Zájem o tuto oblast je podmíněn hlavně ekologickými a ekonomickými důvody. Pozornost je zaměřena na tzv. organokatalyzátory, což jsou chirální organické molekuly schopné katalyzovat různé reakce. Jednou ze skupin takových sloučenin jsou pyridin-*N*-oxidy resp. bipyridin-*N,N*-dioxidy, sloužící v enantioselektivní katalýze jako chirální Lewisovy báze¹.

Cílem naší práce je vyvinout jednoduchou metodu vedoucí k opticky čistým sloučeninám typu bipyridin-*N,N*-dioxid (Schéma 1) a otestovat jejich využití v organické syntéze.

Schema 1



Příprava těchto látek byla založena na [2+2] cyklotrimerizaci pyridyldiinu s nitrily² katalyzované $\text{CpCo}(\text{CO})_2$. Tímto způsobem byla připravena celá řada sloučenin, z nichž byly vybrány pro další použití ty, u kterých se dala předpokládat vysoká racemizační bariera. Tyto bipyridiny byly následně oxidovány na příslušné dioxidy. Čisté enantiomery byly získány kokrystalizací s *S*-potažmo *R*-Binolem. Katalytická aktivita a enantioselektivita nových chirálních nesymetricky substituovaných dioxidů byla testována v Sakurai-Hosomiho reakci (adici allylsilanů na karbonylové sloučeniny). Jako modelové látky byly vybrány substituované benzaldehydy. Dosažené výsledky jsou velice slibné: katalyzátory mají TON větší než 100 i při -78°C a enantioselektivita se pohybuje v rozmezí 57–87 % ee v závislosti na použitém aldehydu.

LITERATURA

1. Chelucci G., Murineddu G., Pinna G. A.: *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 1373 (2004).
2. Hrdina R., Stará I.G., Dufková L., Scott M., Císařová I., Kotora M.: *Tetrahedron* 62, 968 (2006).

STUDIUM HOMEBOXOVÝCH GENŮ SLAKOVODNÍ MEDÚZY *CRASPEDACUSTA SOWERBYI*

**MILUŠE HROUDOVÁ, ČESTMÍR VLČEK, HYNEK
STRNAD, ZDENĚK KREJČÍK a VÁCLAV PAČES**

*Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky,
Flemingovo náměstí 2, 16637 Praha 6
hroudova@img.cas.cz.*

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

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

V naší práci jsme se zaměřili na některé méně časté rodiny homeoboxových genů (SIX, POU a LIM). Na základě specifické analýzy (HMM analýza) databází průběžných sekvenčních dat (TRACE data) příbuzných žahavců byly navrženy degenerované primery na příslušné specifické domény jednotlivých rodin. Metodou PCR byly získány genové fragmenty, které byly ověřeny sekvenací a metodou RACE byly následně prodlouženy na celé hledané geny. Bylo identifikováno několik zástupců homeoboxových rodin SIX a POU a provedeno porovnání s některými dalšími

žahavci a vyššími živočichy. Tato práce bude dále pokračovat testováním transkripce jednotlivých genů v různých tkáních dospělých jedinců i některých vývojových stádií metodou in situ hybridizace. Dále se zaměříme na identifikaci a studium dalších homeoboxových genů.

Tato studie byla podporována výzkumnými záměry a granty MŠMT IM6837805002 (Center for Applied Genomics) a NB Project AC CZ AV0Z50520514.

ANALÝZA PRIMÁRNÍCH INTERAKCÍ HOSTITEL - PATOGEN

**ROMAN HRSTKA^a, ZUZANA KROČOVÁ^b, BOŘIVOJ
VOJTĚŠEK^a a JIRÍ STULÍK^b**

^a*Masarykův onkologický ústav, Oddělení experimentální a onkologické patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno;*

^b*Univerzita obrany, Ústav molekulární patologie, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové*

Francisella tularensis je vysoce virulentní fakultativně anaerobní bakterie způsobující zoonózy u řady savců. Přestože byla nedávno dokončena sekvenace genomu *F. tularensis*, mechanismy virulence a intracelulárního přežívání tohoto patogena zůstávají z velké části stále neznámé.

Po infekci myších makrofágů bylo možné pozorovat kontinuální množení tohoto mikroorganismu, dokud nedošlo ke zhroucení celého buněčného aparátu. Bylo prokázáno, že v raných fázích infekce, přibližně po šesti hodinách, dochází k indukci apoptózy. Naopak v pozdějších časových intervalech infekce, asi po třiceti hodinách, byly u buněk pozorovány první známky nekrózy.

Nicméně právě v souvislosti s indukcí apoptózy docházelo překvapivě k aktivaci p42/p44 MAPK a naopak k inhibici p38 MAPK. Vzhledem ke zdánlivě nelogičnosti těchto procesů byla provedena analýza genové exprese příslušných signálních drah. Bylo zjištěno, že po infekci dochází k signifikantnímu nárůstu exprese genů navozujících autofagii, pro jejíž iniciaci je právě aktivace p42/p44 MAPK zásadní. Tato hypotéza byla následně potvrzena na základě konverze MAP-LC3-I na MAPLC3-II a především pak pomocí elektronové a konfokální mikroskopie.

LITERATURA

1. Hrstka R., Vojtěšek B.: *Voj. Zdrav. Listy* 71, 29 (2002).
2. Hrstka R., Stulík J. a Vojtěšek B.: *ELSO Conference, Dresden, 20-24 September 2003.*
3. Hrstka R., Stulík J., Vojtěšek B.: *Microbes Infect.* 4, 619 (2005).

ŘÍZENÍ STEREOSELEKTIVITY ENZYMU FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝMY PARAMETRY

**RADKA CHALOUPKOVÁ, ZBYNĚK PROKOP,
MONIKA STRAKOVÁ, TOMÁŠ MOZGA a JIRÍ
DAMBORSKÝ**

Loschmidtovy laboratoře, Masarykova univerzita, Kamenice
5/A4, 625 00 Brno
jiri@chemi.muni.cz

Využitelnost enzymů k produkci vysoce čistých chemikálií v průmyslových procesech vyžaduje splnění celé řady kritérií. Uvažujeme-li aplikace v asymetrických biosyntézách, pak jedním z významných kritérií je enantioselektivita. Mnohé enzymy nejsou schopny při fyziologických podmínkách produkovat látky vysoké stereochemické čistoty. Manipulace s fyzikálně-chemickými parametry může představovat atraktivní způsob pro dosažení požadované úrovně kontroly a řízení stereochemie enzymové katalyzovaných reakcí. V této práci byl studován vliv teploty a pH na strukturní stabilitu, aktivitu a enantioselektivitu enzymu. Jako modelový enzym byla vybrána halogenalkandehalogenasa DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (cit.¹). DbjA vykazuje novou substrátovou specifitu¹ a je současně prvním enzymem z rodiny halogenalkandehalogenas s potvrzenou enantioselektivitou. Vysokou enantioselektivitu vykazoval tento enzym k vybraným β -substituovaným bromovaným alkanům a bromovaným esterům².

Aktivita, enantioselektivita a konformační chování DbjA byly studovány při různé teplotě a pH. Konformační změny enzymu byly sledovány pomocí CD spektroskopie. Zjištěná teplota tání (T_m) byla $47,3 \pm 0,2$ °C. Ze strukturního hlediska vykazoval studovaný enzym velkou toleranci ke změně pH. Jeho sekundární struktura nebyla ovlivněna v rozsahu pH 5,3–10,3. V silně kyselém prostředí (pH < 5,3) docházelo k agregaci proteinu, zatímco v silně alkalické prostředí (pH > 10,3) enzym zaujímal neuspořádanou konformaci. Teplotní a pH optima DbjA byla stanovena aktivním měřením se substrátem 1-iodhexanem. Maximální aktivita enzymu byla detekována při 50 °C a pH 9,7. Nejvyšší enantioselektivita DbjA s 2-brompentanem byla naměřena při teplotě 20 °C. Zatímco vliv pH na enantioselektivní rozlišení 2-brompentanu studovaným enzymem nebyl zjištěn, teplota významně ovlivňovala enantioselektivitu DbjA. Snížení teploty z 50 na 20 °C zvýšilo enantioselektivitu DbjA třináctkrát. Na základě naměřené teplotní závislosti enantioselektivity byla vypočtena racemická teplota spolu s diferenčními aktivačními parametry entalpií a entropií pro dehalogenaci 2-brompentanu. Zjištěná racemická teplota byla 85,6 °C, $\Delta_{R-S}\Delta H$ byla -69,5 kJ/mol a $\Delta_{R-S}\Delta S$ byla 0,2 kJ/mol. Enzym DbjA preferenčně katalyzoval entalpicky zvýhodněný (R)-enantiomer 2-brompentanu.

Tato pozorování demonstrují, že halogenalkandehalogenasa DbjA má vysokou aktivitu a strukturní stabilitu v širokém rozmezí pH. Kromě toho může být enantioselektivita DbjA vůči vybraným substrátům vylepšena snížením reakční teploty. Fyzikálně-chemické parametry proto představují významný a velmi snadný způsob pro modelování katalytických vlastností enzymů využitelných v biotechnologiích.

LITERATURA

1. Sato Y., Monincová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K., Tsuda M., Damborský J., Nagata Y.: App. Environ. Microbiol. 71, 4372 (2005).

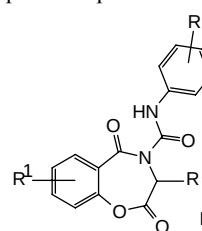
2. Prokop Z., Sato Y., Mozga T., Natsume R., Janssen D. B., Tsuda M., Nagata Y., Senda T., Damborský J.: Nature Biol. Chem., předloženo k publikaci.

NOVÉ SEDMIČLENNÉ CYKLY JAKO PRODUKTY A MEZIPRODUKTY ESTERIFIKACE SALICYLANILIDŮ

A. IMRAMOVSKÝ, J. VINŠOVÁ a F. J. MONREAL

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové
imramovsky@faf.cuni.cz

Salicylanilidy patří mezi antibakteriální látky s vysokou antimykobakteriální aktivitou vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, ale také některým atypickým kmenům, vůči nimž jsou běžná antituberkulotika méně účinná či neúčinná^{1,2}. Pro biologický účinek je nezbytná fenolická hydroxyskupina, která je pravděpodobně zodpovědná za rozpojení oxidativní fosforylace. Naše snaha o její esterifikaci aminokyselinou vede k nové skupině biologicky aktivních látek typu proléčiv, u kterých zůstane zachována vysoká aktivita,lepší se rozpustnost a sníží toxicita.



Při přípravě esterů aminokyselin s neúčinnějšími salicylanilidy byly zjištěny nečekané cyklizace za vzniku zcela nových sedmičleenných *ortho*-kondenzovaných heterocyklů – substituovaných 3,4-dihydro-benzo[*f*][1,4]-oxazepin-2,5-dionů I. Tyto typy sloučenin nejsou v literatuře dosud popsány, nebyla nalezena ani jejich zjednodušená struktura.

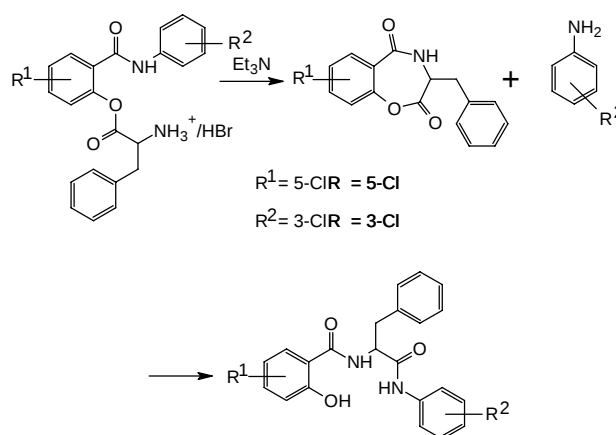


Schéma 1

Jejich vznik byl prokázán při esterifikaci některých salicylanilidů s Z-Gly a Z-L-Ala, hrají však také roli při přesmyku uvolněné aminoskupiny např. esteru fenylalaninu se salicylanilidem (schéma 1), kdy se v rychlém sledu reakcí molekula přeskupí za vzniku diamidu II, jehož struktura byla potvrzena na základě 2D experimentů (GHSQC a GHMQC). NMR, MS. Volný fenolický hydroxyl byl dokázán Emersonovou a Gibbssovou reakcí. K čištění meziproduktů a finálních produktů byl s úspěchem použit Chromatotron, Model 7924T, který je vysoce účinnou a rozpouštědla šetřící chromatografickou metodou.

Príspevek vznikl za finanční podpory FRVŠ 151/2006, MSM 0021620822 a IGA MZD 1A/8238-3.

LITERATURA

1. Vinšová J., Imramovský A: Ces. Slov. Farm. 53, 294 (2004).
2. Waisser K, Bureš O., Holý P., Kuneš J., a kol.: Arch Pharm. 336, 53 (2003).

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF STYRENE OXIDE ADDUCTS WITH AMINO ACIDS IN HUMAN GLOBIN

MICHAL JÁGR, JAROSLAV MRÁZ, KAREL CTIBOR, VLADIMÍR STRÁNSKÝ, and MARTIN POSPÍŠIL

National Institute of Public Health, Šrobárova 48,
100 42 Prague 10
michal.jagr@centrum.cz

Styrene, an important monomer used in plastics industry, is metabolized to a genotoxic intermediate styrene-7,8-oxide (SO). Besides extensive detoxification through the enzyme-mediated hydrolysis, a minor part of SO can produce stable covalent adducts at various nucleophilic sites in the body, e.g. with DNA or proteins. In blood protein globin, the amino acids reported to form adducts with SO are Cys, His, Asp, Glu, N-terminal Val, Lys, and Tyr. However, several SO adduct species are commonly detected for each amino acid because of simultaneous formation of both 2-hydroxy-1-phenylethyl (21HPE) and 2-hydroxy-2-phenylethyl (22HPE) regioisomers, combined with the diastereomerism due to the chiral properties of SO. Additionally, binding of SO to His can occur via N π or N τ in the imidazol ring of His.

The main aim of our study was to identify major isomers of the SO adducts with Cys, Lys, and His in human globin. For reference purposes, the synthetic standards were prepared. The (S)- and (R)- SO enantiomers were reacted with Cys or N α -protected Lys and His. Following deprotection and purification on a silica gel column, the individual isomers were separated by semi-preparative HPLC and characterized using GC/MS, HPLC/MS, and 1H-NMR. Human globin incubated with a 100-fold molar excess of SO was hydrolyzed with pronase. Released amino acids and adducts were then derivatized by a tert-butyldimethylsilyl reagent, and analyzed by GC-MS. The

most abundant regioisomers were 21HPE in Cys-SO and Lys-SO, and N τ -22HPE in His-SO. All remaining regioisomers were also detected. The diastereomers were not resolved by GC, however, some pairs could be separated by HPLC. The most abundant SO adducts can serve as potential biomarkers of the exposure to styrene.

This study was supported by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, grant NJ/7387-3.

REFERENCES

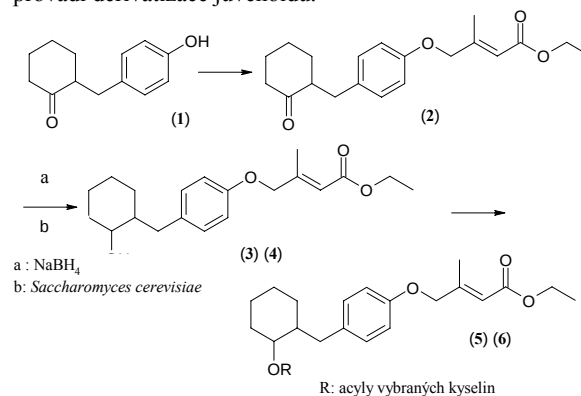
1. Kaur S., Hollander D., Haas R., Burlingame A.L.: J. Biol. Chem. 264, 16981 (1989).
2. Basile A., Ferranti P., Mamone G., Manco I., Pocsfalvi G., Malorni A., Acampora A., Sannolo N.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 871 (2002).
3. Mráz J., Jágr M., Chvalová D., Šimek P., Nohová H., Šmigolová P.: *Sixth International Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health, Heidelberg, Germany, September 6-8, Book of abstracts*, pg. 122 (2004).
4. Campbell J. B.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 1983, 1213.

ESTERY VYBRANÝCH MASTNÝCH KYSELIN A BIOLOGICKY AKTIVNÍCH ALKOHOLŮ JAKO MOŽNÉ HORMONOGENNÍ LÁTKY PŘI REGULACI HMYŽÍCH ŠKŮDCŮ

**ONDŘEJ JURČEK^a, JITKA MORAVCOVÁ^a
a ZDENĚK WIMMER^b**

^aVŠCHT, Ústav chemie přírodních látek, Technická 5,
160 28 Praha 6; ^bÚOCHB AV ČR, Oddělení přírodních
látek, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6

Práce se týká syntézy analogů juvenilních hormonů (juvenoidů), biologicky aktivních sloučenin, které mohou mít vliv na morfologii a fyziologii vybraných druhů hmyzu a mohou účinně a ekologicky snížit hustotu populací hmyžích škůdců. Za účelem modifikace vlastností juvenoidní molekuly (protrahovaný účinek, možnost aplikace do organismu společně s potravou apod.) se v další fázi syntézy provádí derivatizace juvenoidu.



V tomto výzkumu jsme se zaměřili na esterifikace vybranými mastnými kyselinami. Vzniklé estery (juvenogeny) je možné považovat za aplikační formy analogů juvenilních hormonů. V trávicím traktu hmyzu, při perorálním podání, dochází k rozštěpení esterové vazby a k pomalému uvolňování analogu juvenilního hormonu do organismu. Výchozím meziproduktem syntézy juvenoidů této série je 2-(4-hydroxybenzyl)-1-cyklohexanon (1), který postupem naznačeným ve Schématu 1 poskytl isomerní juvenoidy (3) a (4), které byly v posledním reakčním kroku transformovány v juvenogenní estery (5) a (6).

Připravené estery byly testovány v laboratořích na svou biologickou účinnost a výsledky byly porovnány mezi sebou.

COST projekt D29.001 (MŠMT).

FLUORESCENČNĚ ZNAČENÉ LIGANDY NMDA RECEPTORU

**VOJTĚCH KAPRAS^{a,b}, HANA CHODOUNSKÁ^a
a LADISLAV VYKLIČKÝ, Jr.^c**

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6; ^bPřírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^cFyziologický ústav, AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
kapras@uochb.cas.cz

Procesy v centrální nervové soustavě jsou posledních několik let předmětem četných studií. Ve středu pozornosti stojí synaptické receptory a jejich vlastnosti, z chemického hlediska zvláště pak neuroaktivní látky¹. Naše práce se zaměřuje na syntézu polárních derivátů neurosteroidů ovlivňujících aktivitu NMDA receptoru, speciálně pak na vztah mezi zkoumaným steroidem a vazebným místem².

Pro popis vazebného místa jsou nezbytné fluorescenčně značené syntetické deriváty. Jejich příprava je cílem předkládané práce. Na základě námi dříve zjištěných strukturně-aktivitních závislostí byly deriváty nativních neurosteroidů, substituované v polohách 7, 17 a 21, v dalším postupu uvažovány jako fyziologicky neúčinné. Naše pozornost se zaměřila na substituci v poloze 3 a 11 steroidního skeletu, neboť substituenty v těchto polohách neodporují vazbě steroid-receptor.

Nejlépe je prostudována vazba fluorescenčních značek na aminoskupinu substrátu³. Proto jsme jako modelové sloučeniny zvolili steroidní konjugáty s aminokyselinami.

Byly připraveny fluorescenčně značené sloučeniny a ověřena jejich aktivita na NMDA receptoru.

Grant: GAAV ČR IAA4055305, výzkumný záměr Z4 0550506

LITERATURA

1. Dorda, M., Vlček, K., Chodounská, H., Vyklický, L. Jr.: *Psychiatrie, Supplementum* 3, 5 (2001).
2. Abdrachmanova, G., Chodounská, H., Vyklický, L. Jr.: *Eur. J. Neurosci.* 14, 495 (2001).

3. Gustav Akk, Hong-Jin Shu, Cunde Wang, Joe Henry Steinbach, Charles F. Zorumski, Douglas F. Covey, Steven Mennerick: *J. Neurosci.* 25, 11605 (2005).

CHARACTERIZATION OF *TRICHOILHARZIA REGENTI* CERCARIAL PEPTIDASES

**MARTIN KAŠNÝ^a, LIBOR MIKEŠ^a, KATEŘINA DOLEČKOVÁ^a, STEPHANIE FERRET-BERNARD^b,
and PETR HORÁK^a**

^aDepartment of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic,

^bDepartment of Biology (Area 5), The University of York, P.O. Box 373, YO10 5YW, York, U.K.

Proteolytical enzymes (peptidases) are essential for the life cycle of many trematode species and other parasites¹. Peptidases of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* represent a key factor in the disruption of outer squamous layer of the skin during the invasion into their host (ducks). After penetration the larve (schistosomula), uniquely among the schistosomes, migrates through the peripheral and central nervous system (spinal cord, brain and olfactorial nerves) to the nasal area where adults lay eggs². Although the *T. regenti* parasites can complete their life cycle only in a bird, their cercariae are able to invade mammals including man and survive for a limited period of time³. Repeated invasion can stimulate an allergic reaction in man, which is manifested as cercarial dermatitis⁴.

Using ZAP cDNA library from sporocyst (*T. regenti* snail larvae stage) and employing PCR the full-length *T. regenti* cathepsin B1 (cysteine peptidase) was amplified. By DCG-O4 - irreversible cysteine peptidase affinity probe we identified a 33 kDa protein, probably cathepsin B1 too. The predominant cysteine peptidase activity in *T. regenti* cercariae was detected with the panel of fluorogenic synthetic peptidyl amidomethylcoumarin substrates and specific inhibitors. Major proteins from *T. regenti* cercarial extracts were analyzed by mass spectrometry methods (MALDI TOF/TOF). Recorded results were continually compared with human trematode *Schistosoma mansoni* (causes parasitic disease - schistosomiasis) and some significantly similar biochemical and functional characteristics of peptidases were observed. Based on this study we disclose the possibility to use non-human specie *T. regenti* as an alternative laboratory model in development of new chemotherapeutics or vaccine against *S. mansoni* trematodes.

The work was supported by Collaborative Research Initiative Grant (University of York, UK - Charles University, CZ), Wellcome Trust. POST DOC grant (no.524/04/P082), Grant agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Dalton J.P., Brindley P.J.: v: *Adv. Trematode Biol.* 1997, 265.
2. Hrádková K., Horák P.: *J. Helminthol.* 2002, 76.

3. Kouřilová P., Syřůček M., Kolářová L.: *Parasitol. Res.* 2004, 93.
4. Horák P., Kolářová L., Adema C.M.: *Adv. Parasitol.* 2002, 52.

A RECOMBINANT MAIZE β -GLUCOSIDASE RETARGETED TO THE VACUOLE REVEALS THAT THE VACUOLE IS THE STORAGE ORGANELLE FOR t-ZEATIN-O-GLUCOSIDE

NAGAVALLI S. KIRAN^{a,b,c}, EVA BENKOVÁ-FRIMLOVÁ^{b,*}, ALENA REKOVÁ^b, JIŘÍ MALBECK^d, and BŘETISLAV BRZBOHATÝ^{b,c}

^aDept Functional Genomics Proteomics, Masaryk University, CZ-611 37 Brno, CR; ^bInstit. Biophysics AS CR, CZ-612 65, Brno, CR; ^cDepart Mol. Biol. Radiobiol., Mendel University of Agriculture and Forestry, CZ-613 00 Brno, CR; ^dInst. Exp. Botany AS CR, CZ-165 02 Prague, CR. *Present Address: Centre for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

Cytokinins (CKs), N⁶-substituted adenines, are a class of plant hormones with the ability to trigger cell division in conjunction with auxin in tissue culture. They are also involved in regulating a wide range of developmental processes such as chloroplast differentiation, nutrient assimilation and translocation, seed germination, leaf expansion, flowering and senescence. CKs bearing a hydroxylated isoprenoid substituent are called zeatin-type CKs after trans-zeatin (6-[4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylamino]purine), the most abundant naturally-occurring CK.

CKs in plant cells are distributed among the various sub-cellular compartments in a manner that is as yet poorly understood. It is known that t-zeatin-O-glucoside (ZOG) occurs transiently in chloroplasts and is enriched in vacuoles of *Chenopodium rubrum* when cell cultures are supplied with labelled CK.

A molecular tool for exploring the regulation of the intracellular metabolic conversions of CKs requires that the following two conditions be satisfied:

- a) The tool disrupts normal metabolism in a tractable fashion, e.g., by releasing active hormone from a transient “store” of inactive conjugates.
- b) Transgenic plants are available that express the tool in different sub-cellular locations.

A β -glucosidase, Zm-p60.1, was isolated from maize coleoptiles and shown to release active CK from its storage forms, and was subsequently shown to be localized to the plastid. Using recombinant DNA technology, the cDNA encoding the wild-type enzyme (with the native plastid-targeting signal peptide) was modified so that the recombinant version was localised to the vacuole. Transgenic plants over-expressing this re-targeted version were constructed and thus the above two conditions were satisfied.

The results presented show that cytokinin metabolism is disrupted in the transgenic plants. The differing location of the enzyme in the two variants disrupts CK metabolism in

different ways. We also present evidence, for the first time from intact plants, that the terminal storage organelle for ZOG is the vacuole.

Supported by grants from the Ministry of Education of the Czech Republic (Nos. MSM 143100008 and LN00A081), the AS CR (AVOZ50040507), the GA AS CR (No. IAA600380507 and IAA600040612).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGICKÝ VÝZNAM, AEROBNÍCH FOTOSYNTETICKÝCH BAKTERIÍ

MICHAL KOBLÍŽEK^{a,b}, MICHAL MAŠÍN^{a,b} a ONDŘEJ PRÁŠIL^{a,b}

^aMikrobiologický ústav AV ČR, Opatovický mlýn, 379 81 Třeboň; ^bÚstav fyzikální biologie JČU, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

Nedávný objev přítomnosti aerobních fotosyntetických bakterií v tropickém Pacifiku vzbudil silný zájem o tuto skupinu mikroorganismů. Následná studie prokázala, že v oligotrofních vodách severovýchodního Tichého oceánu tvoří tyto organismy kolem 10 % mikrobiálního společenstva. Aerobní fotosyntetické bakterie představují malou podskupinu Proteobakterií, obsahují fotosyntetická reakční centra tvořená bakteriochlorofylem a na rozdíl od svých blízkých příbuzných purpurových bakterií jsou striktně aerobní.

Přítomnost fotosyntetických bakterií jsme sledovali v různých lokalitách světového oceánu pomocí unikátního vysoce citlivého fluorometru, který byl vyvinut ve spolupráci s firmou Photon Systems Instruments s.r.o. Brno. V oligotrofních oblastech jižního Tichého oceánu (transekt Velikonoční ostrov - Concepción, Chile) se množství bakteriochlorofylu pohybovalo od 0,5-1 pM. Podobné výsledky jsme zaznamenali i v Atlantickém oceánu, kde byl zmapován poledníkový transekt z Kapského města (Jižní Afrika) do Falmouth (Velká Británie). Fotoheterotrofní bakterie jsou přítomny v povrchové vrstvě do 200 m v celé studované části Atlantiku, tj. od nízkých do středních zeměpisných šířek. V oligotrofních oblastech se množství bakteriochlorofylu pohybovalo mezi 0,5-2 pM, v bohatých oblastech severního Atlantiku se obsah zvýšil až na 6 pM.

Fotosyntetické bakterie byly též registrovány v eutrofním Baltském moři. V této oblasti podléhá množství fotosyntetických bakterií výrazným sezónním výkyvům s ročním maximem v květnu, s přibližně měsíčním zpožděním za jarním maximem fytoplanktonu. Množství fotoheterotrofů pak s nástupem podzimu pozvolna klesá a je téměř zanedbatelné v zimě.

Kolem 40 kmenů fotoheterotrofních bakterií bylo vyizolováno z různých oblastí světového oceánu. Na základě sekvenace genů 16S ribozomální podjednotky byly vyizolované kmeny zařazeny do třech základních rodů *Roseobacter*, *Erythrobacter* a *Citromicrobium* náležejících do skupiny α -Proteobakterií. Izolát *Erythrobacter* sp. NAP1 byl navržen k celkové sekvenaci genomu, kterou provedl Ventrův Institut metodou shotgun. Předběžná manuální anotace potvrdila přítomnost genů pro bakteriální reakční

centra, geny pro asimilaci CO₂ či fixaci dusíku však nalezeny nebyly. To odpovídá faktu, že získané kmeny nejsou schopny čistě autotrofního růstu a vyžadují přítomnost organického substrátu. Pomocí současného měření respirace a fotosyntézy bylo zjištěno, že tyto organismy mohou částečně nahrazovat energii oxidativní fosforylace pomocí fotofosforylace. Fotosyntetická reakční centra tak slouží jako alternativní zdroj ATP. Tato metabolická strategie je zřejmě výhodná v mořském ekosystému charakteristickém omezenými zdroji živin. Fotosyntetické bakterie tvoří 1–10 % veškerých mořských bakterií, což signalizuje jejich významnou roli v mořském uhlíkovém cyklu.

LITERATURA

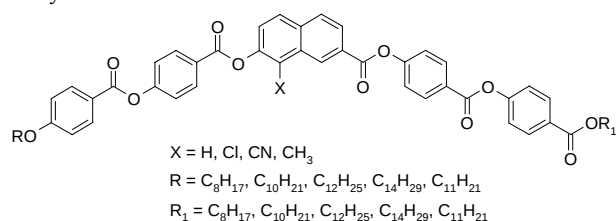
1. Koblížek M., Beja O., Bidigare R. R., Christensen S., Benetiz-Nelson B., Vetriani C., Kolber M. K., Falkowski P. G., Kolber Z. S.: Arch. Microbiol. 180, 327 (2003).
2. Koblížek M., Egiert-Stoň J., Sagan S., Kolber Z. S., Falkowski P. G.: FEMS Microbiol. Ecol. 51, 353 (2005).
3. Kolber Z. S., Plumley F. G., Lang A. S., Beatty J. T., Blankenship R. E., VanDover C. L., Vetriani C., Koblížek M., Rathgeber C., Falkowski P. G.: Science 292, 2492 (2001).

DESIGN, SYNTÉZA A STUDIUM MESOMORFNÍCH VLASTNOSTÍ LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ NA BÁZI DERIVÁTŮ 7-HYDROXYNAFTALEN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY

MICHAL KOHOUT^a, VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

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

Studium lomených kapalných krystalů prochází bouřlivým rozvojem. Nedávno jsme v této oblasti zavedli nový typ centrálního jádra a využili jej pro syntézu nových typů kapalně-krytalických materiálů^{1–3}. Cílem této práce bylo připravit nové typy nesymetrických lomených kapalných krystalů odvozených od 7-hydroxynaphtalen-2-karboxylové kyseliny (Obr. 1) a studovat jejich mesomorfní chování pomocí DSC, studium textur a rentgenostrukturní analýzou.



Obr. 1

Budou diskutovány vlastnosti nově připravených a dosud nepopsaných derivátů centrálního jádra dále pak rozdíly způsobené záměnou centrálního jádra, vliv substituce tohoto jádra a délky postranních řetězců na celkové změny v mesomorfním chování jednotlivých kapalných krystalů v připravených seriích nových látek.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 202/05/0431) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM223100001).

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weisslog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 13, 2104 (2003).
2. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: Liq. Cryst. 32, 1151, (2005).
3. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: Liq. Cryst. 33, 41 (2006).

OBRANNÉ REAKCE BRASSICA NAPUS NA HOUBOVÝ PATOGEN LEPTOSPHERA MACULANS

BARBORA KORBELOVÁ^{a,b}, JÓSEF FODOR^c, KÁROLY BÓKA^d, LENKA BURKETOVÁ^a a OLGA VALENTOVÁ^b

^aÚstav experimentální botaniky, AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6, ČR, ^bÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 3, 160 28 Praha 6, ČR, ^cDepartment of Plant Anatomy, Eötvös Loránd University, Budapest 1117, Pázmány Péter sétány 1/C, Maďarsko, ^dPlant Protection Institute of the Hungarian Academy of Science, Budapest 1022, Herman Ottó út 15, Maďarsko
korbelova@ueb.cas.cz

Cílem této práce je studium obranných reakcí *Brassica napus* na houbového patogena *Leptosphaeria maculans*. *L. maculans* způsobující fomovou hnilobu je nejzávažnější a nejrozšířenější patogen rostlin rodu *Brassica*, zejména *B. napus* a *B. rapa*. V této práci jsou použity dva izoláty *L. maculans* – virulentní a avirulentní.

Během obranných reakcí na patogena dochází k tvorbě kalózy, která je stanovena spektrofotometrickou a mikroskopickou metodou pomocí specifického barvení anilinovou modří. Virulentní izolát vyvolává v rostlinách vyšší akumulaci kalózy než izolát avirulentní. Při mikroskopickém pozorování je patrné, že virulentní izolát *L. maculans* prorůstá děložním listem, zatímco avirulentní izolát je lokalizován v blízkosti místa inokulace. Dalším způsobem obrany *B. napus* proti patogenu je produkce reaktivních forem kyslíku, zejména peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je stanoven spektrofotometrickou metodou pomocí xylenolové oranže *in vitro* a specifickým barvením 3,3'-diaminobenzidinem (DAB) *in situ*. U rostlin infikovaných avirulentním izolátem *L. maculans* je tvorba peroxidu vodíku rychlejší než v případě infekce virulentním izolátem. Barvení

pomocí DAB ukazuje, že peroxid vodíku je lokalizován v děložním listu v blízkosti hyf *L. maculans*. V infikovaných rostlinách dochází k indukci PR-proteinů. Tato indukce je sledována molekulárně-biologickými metodami pomocí exprese PR1 a PR2 genů. Expres PR genů je hodnocena pomocí RT-PCR. V infikovaných rostlinách je exprese genů PR1 a PR2 vyšší než v kontrolních rostlinách.

Získané výsledky rozšiřují dosavadní poznatky o obranné odpovědi *B. napus* při kompatibilní a inkompatibilní interakci s *L. maculans*.

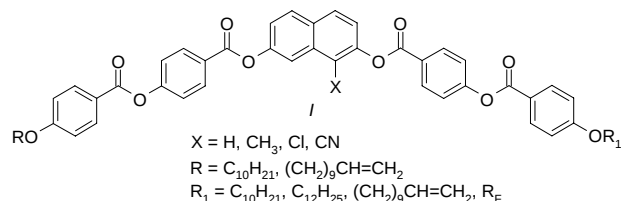
Tato práce je podporována granty MŠMT KONTAKT CZ-4 a MŠMT IP05ME825.

SYNTÉZA A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI NOVÝCH LOMENÝCH KAPALNĚ KRystalických MATERIÁLŮ

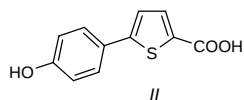
ANNA KOVÁŘOVÁ^a, VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

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

V posledních letech jsme připravili řadu látek odvozených od 1-substituovaných naftalen-2,7-diolů, které vykazovaly různé typy mesofází^{1,2}. Z naměřených výsledků je zřejmé, že zavedení tohoto centrálního jádra je velmi perspektivní, a proto se nadále zabýváme syntézou molekul odvozených od tohoto jádra. Tato práce pojednává o syntéze a fyzikálních vlastnostech nesymetrických kapalně krystalických monomerů³ a dále pak látek s parciálně perfluorovaným koncovým řetězcem *I*.



Dále se zabýváme přípravou nové série látek, jejichž centrální jádro je odvozeno od thiofen-2-karboxylové kyseliny *II*.



Mesomorfni chování nových látek bylo studováno pomocí DSC, studií textur a rentgenostrukturní analýzou.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 202/05/0431) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM 223100001).

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weissflog W., Diele S., Pelzl G.: *J. Mater. Chem.* 13, 2104 (2003).
2. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: *Liq. Cryst.* 32, 1151 (2005).
3. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: *Liq. Cryst.* 33, 41 (2006).

STANOVENÍ EXPRESNÍCH PROFILŮ U PACIENTŮ S MYELODYSPLASTICKÝM SYNDROMEM (MDS)

A. KRÁČMAROVÁ, H. BRUCHOVÁ, J. ČERMÁK a R. BRDIČKA

ÚHKT, U Nemocnice 2, 128 20 Praha 2
alzbeta.kracmarova@uhkt.cz

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu onemocnění neefektivní hematopoézy, která postihují kmenové buňky kostní dřeně. Charakteristickými projevy MDS jsou dysplázie v několika vývojových řadách, periferní cytopenie a zvýšené riziko leukemické transformace, neboť přibližně u 1/3 všech diagnostikovaných pacientů dochází k přechodu MDS v akutní myeloidní leukemii (AML). MDS postihuje zvláště starší populaci, přičemž incidence tohoto onemocnění je odhadována v intervalu 3.5-10/100 000. Jediným přístupem umožňujícím vyléčení pacienta nadále zůstává alogenní transplantace kmenových buněk. Široké spektrum klinických, morfoloických a genetických projevů se stalo základem pro pozdější rozlišení jednotlivých podtypů (FAB či WHO klasifikace).

Etiologie a kompletní genetické pozadí MDS nejsou doposud uspokojivě vysvětleny, přičemž právě biočipové technologie usnadňují řešení těchto otázek, díky možnosti současného testování (kvalitativní i kvantitativní) velkého počtu genů v rámci jednoho vzorku. Stejně jako v případě jiných maligních onemocnění je zvláštní pozornost soustředěna zejména na stanovení expresních profilů onkogenů, tumor-supresorových a genů regulujících buněčný cyklus^{1,2,3}.

Vyšetřovaný soubor zahrnoval celkem 12 pacientů s MDS v době stanovení diagnózy (3 pacienti s RA/5q-, 3 pacienti s RCMD, 3 pacienti s RAEB II a 3 pacienti s RAEB-T) a 1 pacienta se sekundární AML transformované z MDS. Pro stanovení expresních profilů byly použity nylonové membrány Atlas Human Cancer cDNA Arrays (Clontech) s 588 sondami pro geny, které se mohou účastnit nádorové transformace buňky. Z leukocytů periferní krve pacientů byla izolována celková RNA, která byla posléze reverzní transkripcí převedena na komplementární DNA (cDNA) a současně radioaktivně naznačena pomocí α -32P [dATP]. Detekované expresní profily pacientů byly porovnány s expresním profilem kontrolního směsného vzorku, který obsahoval materiál od zdravých jedinců různých věkových skupin. Dvojnásobné zvýšení či snížení

hadiny příslušné mRNA bylo při komparativních analýzách považováno za signifikantní.

U většiny pacientů s MDS byl zaznamenán pokles v expresi 10 genů: junB, casper, CRAF1, c-fms, XRCC1, zyxin+zyxin-2, MMP9, PDGFA, interleukin-13 a RPSA. Změny expresních hladin některých genů úzce korelovaly s příslušným subtypem MDS. Obecně bylo pozorováno, že expresní profily pacientů v počátečních stádiích MDS, tedy refrakterní anémie (RA) a refrakterní cytopenie s multi-lineární dysplázií (RCMD), vykazovaly méně odchylek od kontrolního vzorku než pacienti s pokročilejšími subtypy MDS jako jsou refrakterní anémie s excesem blastů 2 (RAEB II) a refrakterní anémie v transformaci do AML (RAEB-T). Hladiny exprimovaných genů, které byly detekované u pacienta se sekundární AML transformované z MDS, měly velmi podobný charakter jako u pacientů s RAEB-T.

Podpořeno: VZ MZ ČR 0002373602.

LITERATURA

1. Hofmann W.K., Vos S., Komor M., Hoelzer D., Wachsmann W., Koeffler H.P.: *Blood* 100, 3553 (2002).
2. Miyazato A., Ueno S., Ohmine K., Ueda M., Yoshida K., Yamashita Y., Kaneko T., Mori M., Kirito K., Toshima M., Nakamura Y., Saito K., Kano Y., Furusawa S., Ozawa K., Mano H.: *Blood* 98, 422 (2001).
3. Pellagatti A., Esoof N., Watkins F., Langford C.F., Vetrie D., Campbell L.J., Fidler C., Cavenagh J.D., Eagleton H., Gordon P., Woodcock B., Pushkaran B., Kwan M., Wainscoat J.S., Boulton J.: *Brit. J. Haematol.* 2004, 125.

TRIGLYCERIDY EXTRAHOVANÉ Z TUKOVÝCH TĚLEŠ ČMELÁKŮ

EDITA KRAFKOVÁ, JOSEF CVAČKA, JIŘÍ KINDL, OLDŘICH HOVORKA, PAVEL JIROŠ a IRENA VALTEROVÁ

ÚOCHB AV ČR Praha, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
krafkova@uochb.cas.cz

Z předchozího výzkumu¹ vyplynulo, že existuje určitá podobnost mezi složením alifatických látek v samčích značkovacích feromonech² a zastoupením mastných kyselin (včetně od nich odvozených látek) v jejich tukových tělesech. Pomocí různých chromatografických metod bylo tedy analyzováno složení tukových těles samců u vybraných druhů čmeláků a pačmeláků (*Bombus pratorum*, *B. silvarum*, *B. subterraneus*, *Psithyrus bohemicus*, *P. rupestris*).

Tkáňový extrakt byl nejprve rozdělen na tenké vrstvy, odkud byly vybrány a zpracovány pouze triacylglyceroly (TAG). Připravené vzorky byly analyzovány metodou LC/MS s chemickou ionizací za atmosférického tlaku³. Pro lepší separaci TAG byla optimalizována metoda s nevodným chromatografickým systémem. Byly použity dvě reverzní kolony C18 (15 cm a 30 cm dlouhé) zapojené do série⁴.

Kvůli lepší citlivosti pro některé molekulární ionty TAG byla použita postkolonová derivatizace amonnými ionty. V tukových tělesech čmeláků se hojně vykytují triacylglyceroly obsahující šestnácti a osmnáctiuhlíkové kyseliny, a to nejčastěji následující: OLnO, PLnO, PoPoO, PoPoP, POO nebo OOO (kde Ln je linolenová kyselina, O je olejová kyselina, P je palmitová kyselina a Po je palmitolejová kyselina). Mimo to obsahují tuková tělesa čmeláků ještě množství triacylglycerolů s dvanácti, čtrnácti a víceuhlíkatými kyselinami, jejichž zastoupení se u různých druhů liší. Zcela jedinečným se z hlediska TAG ukázal být druh *B. pratorum*, který má velké množství triacylglycerolů obsahujících kyselinu (26:2). Což ukazuje na možnou souvislost se složením feromonu v labiální žláze, kde se vyskytuje pentakosa-7,17-dien.

Vzorky TAG byly dále transesterifikovány a pro identifikaci a kvantifikaci jednotlivých mastných kyselin byla použita metoda GC/MS. Výsledky těchto analýz potvrdily nejhojnější zastoupení šestnácti a osmnáctiuhlíkových mastných kyselin v čmeláčích triacylglycerolech. Ve většině vzorků převládá kyselina olejová. Analýza mastných kyselin pomocí GC/MS dále pomohla upřesnit některé sporné výsledky.

Složení mastných kyselin i triacylglycerolů se zdá být druhově specifické, mezi jedinci stejného druhu existují jen malé rozdíly. Mezi jednotlivými druhy pak existují rozdíly ve výskytu, množství a míry nasycenosti triacylglycerolů.

Práce byla provedena za podpory Grantové agentury AV ČR (grant číslo A4055403 a výzkumného záměru číslo Z4 055 905).

LITERATURA

1. Jiroš P., Luxová A., Valterová I.: *Chem. Listy* 98, 1017 (2004).
2. Luxová A., Valterová I., Stránský K., Hovorka O., Svatoš A.: *Chemoecology* 13, 81 (2003).
3. Cvačka J., Hovorka O., Jiroš P., Kindl J., Stránský K., Valterová I.: *J. Chromatogr., A* 1101, 226 (2006).
4. Holčapek M., Lisa M., Jandera P., Kabátová N.: *J. Sep. Sci.* 28, 1315 (2005).

DEHYDROGENASY METABOLISMU KORTIKOSTERONU U KUŘAT

M. KUČKA^{a,b}, J. BRYNDOVÁ^a, K. MAZANCOVÁ^a, P. KLUSOŇOVÁ^{a,b}, I. MIKŠÍK^a a J. PÁCHA^a

^aFyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha 4
^bPřírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2

Ve mineralokortikoidních tkáních (ledviny, tlusté střevo aj.), hydroxysteroid dehydrogenasy (HSD) chrání tyto tkáně před vysokou koncentrací glukokortikoidů (GK). Zabezpečují tak specifitu účinku aldosteronu přes jinak nespecifický mineralokortikoidní receptor. Naopak, jiné HSD lokálně zvyšují koncentraci aktivních glukokortikoidů a tak výsledná koncentrace aktivních steroidů ve tkáních je spíše závislá na aktivitě těchto enzymů než na jejich plazmatické koncentraci. K inaktivaci kortikosteronu v buňce dochází oxidací na uhlíku

C11 nebo redukci na C20 a je výsledkem aktivit enzymů 11 β -hydroxysteroid dehydrogenasy isoformy 2 (11 β HSD2) a 20-hydroxysteroid dehydrogenasy (20HSD). Zvýšení lokální koncentrace GK je závislé na aktivitě 11 β HSD isoformy 1 (11 β HSD1). V našich experimentech jsme sledovali lokalizaci těchto enzymů v ptáčích tkáních a za využití internetové kuřecí EST databázi a alignment programů jsme sestrojili mRNA sekvenci kuřecího enzymu 20HSD. Získanou sekvenci jsme rekombinantně exprimovali a protein dále purifikovali a podrobili analýze jeho enzymové aktivity. Řezy kuřecích tkání (ledviny, tlusté střevo) metabolizovaly kortikosteron na 20-dihydrokortikosteron a z menší části na 11-dehydro-20-dihydrokortikosteron; játra metabolizovala kortikosteron výhradně na 20-dihydrokortikosteron. Při použití progesteronu jako substrátu řezy kuřecích tkání redukovaly progesteron jen na 20 β -dihydroprogesteron a redukce substrátu byla dependentní na kofaktoru NADPH. Pomocí internetové EST databáze a alignment programů jsme *in silico* sestrojili mRNA sekvenci kuřecího enzymu 20 β HSD a porovnali ji se známými sekvencemi u savčích druhů (75 % sekvenční homologie). Sekvence byla vložena do bakteriálního expresního vektoru pET-15b a rekombinantně exprimovaná v *E. coli* (BL21). Fúzní protein, který byl od cytosolárních proteinů oddělen pomocí Ni-NTA purifikačního systému, metabolizoval kortikosteron na uhlíku C20 na neaktivní 20 β -dihydrokortikosteron. Purifikovaný protein vykazoval NADPH kofaktorovou specifitu a kinetické vlastnosti podobné vlastnostem savčí 20 β HSD. Kvantitativní RT-PCR potvrdila distribuci tohoto enzymu v kuřecích tkáních s nejvyšší expresí mRNA pro 20 β HSD v tlustém střevě a ledvině. Zdá se, že enzym 20 β HSD svojí aktivitou ochraňuje buňky kuřecích tkání před vysokými koncentracemi glukokortikoidů a gestagenů a to zamezením vazby těchto steroidů na nespecifický mineralokortikoidní receptor.

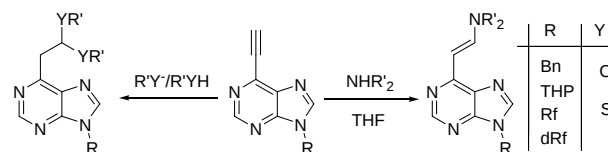
SYNTÉZA FUNKCIONALIZOVANÝCH 6-(ALKYL)PURINŮ NUKLEOFILNÍ ADICÍ NA 6-VINYL NEBO 6-ETHYNYLPURINY

MARTIN KUCHAR[†] a MICHAL HOCEK

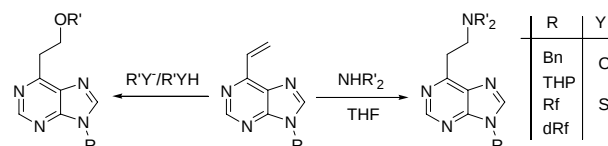
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo
nám. 2, 166 10 Praha 6
Kuchar@uochb.cas.cz

Puriny, substituované v poloze 6, vykazují široké spektrum biologické aktivity¹. Známe jsou antimykobakteriální, antibakteriální a cytotoxické vlastnosti 9-benzyl-6-arylpurinů. Zatím se ale stále málo ví o biologické aktivitě purinů, které mají v poloze 6 funkcionalizované substituenty. Jako vhodná metoda k jejich přípravě se ukázala nukleofilní adice na dvojnou nebo trojnou vazbu²⁻⁴.

Nukleofilní adice primárních a sekundárních aminů na trojnou vazbu vede za laboratorní teploty k příslušným enaminům. Adicí alkoholů a thiolů za katalýzy malým množstvím příslušného alkoholátu (thiolátu) na trojnou vazbu získáme acetal, resp. dithioacetal.



V případě adice *N*-nukleofilů na vinylpuriny jsme za laboratorní teploty získali sérii aminů. Adice alkoholů a thiolů vedla k etherům a sulfidům. Kyselým odstraněním THP chránících skupin jsme získali volné báze.



Tato vypracovaná metodika dosahuje dobrých výtěžků a byla úspěšně použita k syntéze řady nových látek.

Tato práce je součástí výzkumného projektu Z4 055 0506, který byl podporovaný MŠMT "Centrum Nová antivirotika a antineoplastika" 1M0508 a firmou Sumitomo Chemical, Co. (Osaka, Japan). Autoři děkují Dr. Votrubovi za testování biologické aktivity a Dr. Pohlovi za NMR spektra.

LITERATURA

- (a) Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: J. Med. Chem. 43, 181 (2000).
(b) Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: Collect. Czech. Chem. Commun. 66, 483 (2001).
(c) Hocek M., Holý A., Dvořáková H.: Collect. Czech. Chem. Commun. 67, 325. 2002
- Øverås A. T., Bakkestuen A. K., Gundersen L. L., Rise F.: Scan. Chem. Acta 54, 1116 (1997).
- Liu F., Dalhus B., Gundersen L. L., Rise F.: Scan. Chem. Acta, 53, 269 (1999).
- (a) Kawasaki T., Nagatsugi F., Ali Md. M., Maeda M., Sugiyama K., Hori K., Sasaki S.: J. Org. Chem. 70, 14 (2005).
(b) Nagatsugi F., Kawasaki T., Usui D., Maeda M., Sasaki S.: J. Am. Chem. Soc. 121, 6753 (1999).

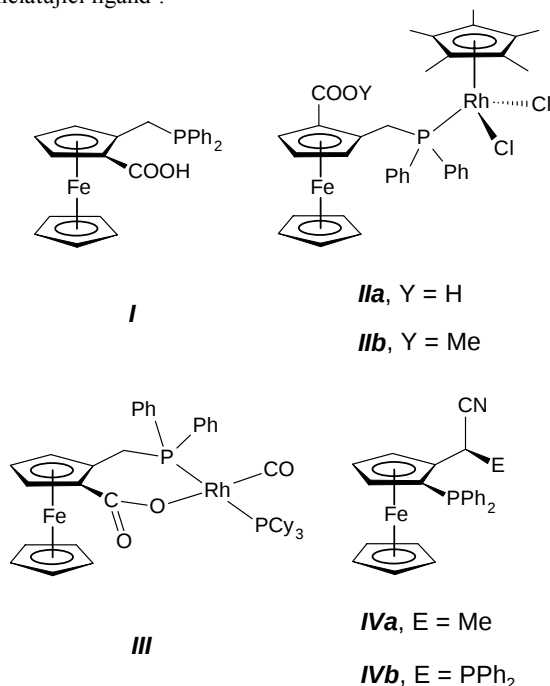
PŘÍPRAVA, CHARAKTERIZACE A KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI NOVÝCH FERROCENOVÝCH FOSFINKARBOXYLOVÝCH KYSELIN

**MARTIN LAMAC[†],* IVANA CÍSAŘOVÁ a PETR
ŠTĚPNÍČKA**

Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta
Univerzity Karlovy, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
lamacm@volny.cz

Fosfinové ligandy obsahující ferrocenový skelet byly v nedávné minulosti úspěšně využity v oblasti katalýzy organických reakcí¹ a další rozvoj aplikací této skupiny látek lze ještě očekávat. V rámci našeho výzkumu jsme se zaměřili na studium chemie ferrocenových fosfinkarboxylových

kyselin², zvláště s ohledem na strukturní rysy jejich koordinačních sloučenin. Aktuálním výsledkem naší práce je příprava racemické 2-[(difenylfosfino)methyl]ferrocenkarboxylové kyseliny (I), izomerní k dříve připravené [2-(difenylfosfino)ferrocenyl]octové kyselině³. Dále byly připraveny modelové komplexy troj- a jednomocného rhodia. Jedná se o komplexy $[\text{RhCl}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{RL-}\kappa\text{P})]$ ($\text{R} = \text{H}$: IIa, $\text{R} = \text{Me}$: IIb), kde HL označuje P-monodentátní kyselinu I a MeL její methylester, a dále o komplex $[\text{Rh}(\text{CO})(\text{L-}\kappa\text{O,P})(\text{PCy}_3)]$ (III), ve kterém se fosfinkarboxylát L- koordinuje jako O,P-chelatuující ligand⁴.



Obr. 1

V současné době se zabýváme syntézou opticky čistých chirálních ferrocenových fosfinkarboxylových kyselin. V průběhu těchto pokusů bylo zjištěno, že α -alkylace racemického [2-(difenylfosfino)ferrocenyl]acetonitrilu probíhá s vysokou stereoselektivitou za vzniku produktů typu IV.5. Popsaná reakce představuje alternativní přístup v syntéze chirálních ferrocenových derivátů.

LITERATURA

- (a) Togni A., Hayashi T. (ed): *Ferrocenes – Homogenous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*. VCH, Weinheim 1995. (b) Colacot T. J.: *Chem. Rev.* 103, 3101 (2003).
- Štěpnička P.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, 3787.
- Štěpnička P., Císařová I.: *Organometallics* 22, 1728 (2003).
- Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: *J. Organomet. Chem.* 690, 4285 (2005).
- Lamač M., Štěpnička P.: *Inorg. Chem. Commun.*, v tisku (2006).

INDUCTION OF EXPRESSION OF NAG-1/MIC-1/GDF-15 IN PROSTATE AND COLON EPITHELIAL CELLS USING NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

EVA LINCOVÁ^{a,b}, KAREL SOUČEK^a, VIKTOR HORVÁTH^a, JIŘINA HOFMANOVÁ^a, and ALOIS KOZUBÍK^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Brno, 612 65; ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno

Colon and prostate cancer are leading cause of cancer death in the Western world. Antitumorigenic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are well established in several types of cancer disease. However, mechanisms driving these processes are not known in all details. Finding the biomolecular mechanisms associated with effects of NSAIDs in prostate and colon cancer is an important endeavor, and potentially will lead to novel treatment strategies. It has been shown that some effects of NSAIDs are independent on inhibition of activity of cyclooxygenases. Induction of NAG-1/MIC-1/GDF-15, gene from transforming growth factor- β superfamily is associated with pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects of some NSAIDs.

In our study, we compared effects of selected NSAIDs on induction of NAG-1 protein in several cancer and non-cancerous prostate and colon epithelial cell lines. We found significant differences in response to treatment by NSAIDs and induction of NAG-1 protein between individual cell lines. Generally, only cells with intact p53 function were able to induce expression of NAG-1 protein after treatment by NSAIDs. This observation correlates with property of NSAIDs to inhibit proliferation and induce apoptosis in p53-null cell lines. Function of NAG-1 protein in effects of NSAIDs was proofed using NAG-1 siRNA in selected cell lines. Our observation showed importance of p53 status in sensitivity to anti-proliferative and pro-apoptotic effects of NSAIDs.

Supported by Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, contract No. Pz-Z2/29 and IGA AV ČR 1QS500040507.

HUMAN CARBONIC ANHYDRASE

P. MADER^a, J. BRYNDA^a, V. KRÁL^a, P. ŘEZAČOVÁ^{a,b}, R. ŠTOURAČOVÁ^{a,c}, M. FÁBRY^a, J. ZÁVADA^a, Z. ZÁVADOVÁ^a, L. RULÍŠEK^d, M. KOŽÍŠEK^d, and J. SEDLÁČEK^a

^aInst. of Molecular Genetics, Flemingovo 2, CZ-166 37 Praha 6; ^bUT SW Med. Ctr, 5323 Harry Hines Blvd, Dallas, Texas 75390; ^cUC at Denver, Health Sciences Ctr, 4200 E. Ninth Ave. Denver, CO 80262; ^dInst. of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo 2, CZ-166 37 Praha 6 mader@img.cas.cz

Among fourteen human carbonic anhydrases, only the CA IX isoform is strongly associated with certain types of cancer. A unique structural feature of CA IX is its extra component - the proteoglycan-like (PG) segment, located at the amino terminus of the molecule. Conceivably, this segment could be of relevance for oncogenesis, therefore it deserves a more detailed investigation.

The PG amino acid sequence [Q16790; gi:5915865] comprises 59 residues:
SSGEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLP
EEDLPEVKPKSEEEGSLKLE

A remarkable feature of the PG segment of the CA IX molecule is a high content of dicarboxylic amino acids (27 D + E out of total 59 residues) and a low content of basic ones (4 R + K). Most of the dicarboxylic amino acids are grouped in four identical repeats of the motif GEEDLP (bold) and in its three modified versions. The epitope peptide used in this study (underlined) seems to be an adequate structural representation of the protein antigen since predictions show lack of any secondary structure in the PG domain. Abnormal expression of CA IX in various commonly occurring carcinomas suggests its involvement in oncogenic pathways. CA IX is also a cell adhesion molecule (CAM) that can mediate attachment of cells to non adhesive solid support¹. For a secondary structure-lacking, flexible peptide it might be intuitively expected that such ligand would adopt a complementary shape and undergo stabilization in the complex with its cognate antibody: this would be accompanied with a loss of the conformational freedom and with an unfavorable entropy contribution, measurable with microcalorimetry methods. We show here that upon the epitope peptide binding a substantial structural re-arrangement occurs also in one of the antibody hypervariable loops and that the accompanying local stabilization can be traced in comparisons of the crystal structures of the free and complexed antibody. Somewhat unexpectedly, all substantial 3D structural transitions occur in the hypervariable loops other than those that form counterparts of the epitope dicarboxylic amino acid residues and that provide for major enthalpy contributions.

REFERENCES

1. J. Závada, Z. Zavadová, J. Pastorek, Z. Biesová, J. Ježek, J. Velek: Br. J. Cancer. 82, 1808 (2000).

PROCARYOTIC EXPRESSION OF THE NUCLEOCAPSID PROTEIN GENE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 AND USE OF THE PROTEIN IN ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME IN PIGS

ZUZANA MARČEKOVÁ^a, EVA KOSINOVÁ^b, IVAN PŠIKAL^b, and PETER ŠEBO^a

^aInstitute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague; ^bVeterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 32 Brno

Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is now a well-established disease of swine herds, causing important economic losses in many European countries, North America and Asia. PMWS is linked to the emergence of a new porcine circovirus type 2 (PCV2) that is a small non-enveloped circular single-stranded DNA virus in the Circoviridae family. PCV2 has two major open reading frames (ORFs). ORF1 encodes the viral replicase and is less variable, while ORF2 encodes the viral capsid protein (Cap) and displays a higher rate of variation. This implies that ORF2 may determine the type-specific features of PCV2. Simple and reliable diagnostic methods are sorely needed for detection of PCV2-specific antibodies and monitoring of PCV2 infection. In this study, we aim to develop a modified direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of PCV2 using the recombinant capsid protein Cap as an antigen. The cap gene was cloned using an E. coli expression vector yielding Cap protein fused to a C-terminal 6xHIS affinity tag (Cap-6xHIS). Unfortunately, however, no expression was observed. It is shown that lack of expression of Cap-6xHIS was due to rare codon usage in 5' portion of cap gene encoding an arginine rich N-terminal sequence MTPRRRRYRRRRHRPRSHLG. When this sequence was deleted, the final Cap Δ 20aa-6xHIS protein was produced at high levels. The purified truncated protein has been successfully used to develop an ELISA (Δ CapELISA) for serological detection of PCV2 infection in pig farms. Comparison of the Δ CapELISA with commercially available SERELISA[®] PCV2 Ab Mono Blocking shows a higher sensitivity of the Δ CapELISA.

ANALÝZA INTERAKCÍ RODIČOVSKÝCH GENOMŮ MEZIDRUHOVÉHO HYBRIDA *S. LATIFOLIA* x *S. VISCOSA* NA CYTOGENETICKÉ ÚROVNI

MICHAELA MARKOVÁ

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav, AV ČR, Brno

Rod *Silene* L. z čeledi *Caryophyllaceae* (hvozdíkovité) představuje jedinečný systém pro studium determinace pohlaví a evoluce pohlavních chromozomů u rostlin, neboť do tohoto rodu patří druhy s rozličnými strategiemi determinace pohlaví. Dioecie (dvoudomost) se zde objevila v období před 8–24 milióny let, zatímco u savců již před 300 milióny let. Je zde tedy možno studovat raná stádia evoluce pohlavních chromozomů. Tento rod je také velmi vhodný pro konstrukci mezidruhových hybridů a to zejména proto, že všechny dvoudomé druhy zde mají stejný počet chromozomů ($2n=24$). Dvoudomá *S. latifolia* byla opylena *in planta* hermafroditní *S. viscosa* za účelem studia interakce rodičovských genomů.

Metoda GISH (genomic *in situ* hybridization) umožnila jednoznačně rozlišit rodičovskou příslušnost chromozomů v hybridu. V interfázi zůstávají rodičovské genomy separovány a tvoří domény. Mitóza probíhá bez aberací, což svědčí o stabilitě hybridního genomu. Podrobnější analýza

chromozomů pomocí FISH sond ukázala, že hybrid má striktně aditivní charakter a nedochází u něj k žádným přestavbám. Repetitivní sekvence X43.1, izolovaná z *S. latifolia*, se u *S. viscosa* nenachází a je tedy zřejmě druhově specifická. Studovala jsem také lokalizaci markeru DD44, který je u *S. latifolia* vázán na pohlavní chromozomy. Byly nalezeny signály v genomu *S. viscosa*, a také na jednom autozomu pocházejícím z *S. viscosa* v hybridovi. Dle všeobecně uznávané teorie evoluce pohlavních chromozomů, se tyto vyvinuly z páru autozomů. Zde se tedy nabízí velmi zajímavá otázka, zda je tento autozom *S. viscosa* evolučním příbuzným pohlavních chromozomů. Jsou chromozomy *S. latifolia* schopné párovat se v meióze se svými homeology u *S. viscosa*? Případně párování chromozomu X s jeho homeologem by umožnilo přímo studovat rozsah homologie a událostí vedoucí ke vzniku pohlavních chromozomů (delece, inverze, duplikace ...)

Podrobná cytogenetická analýza odhalila nepravidelný průběh meiózy. Zvláště v anafázi I a anafázi II dochází ke vzniku četných opožděných chromozomů a můstků. Zjistila jsem, že chromozomy *S. latifolia* a *S. viscosa* se již při meióze téměř nejsou schopny párovat. Tyto chromozomy zřejmě v průběhu evolučních změn divergovaly natolik od svého společného předka, že zde již není možné na cytogenetické úrovni párování analyzovat. Neschopnost synapse chromozomů může být způsobena také rozdílem ve velikosti rodičovských genomů. Chromozom X je asi dvakrát větší než průměrný autozom *S. viscosa*. GISH a FISH dokumentují, že právě chromozom X se na můstcích podílí velmi často. Skutečnost, že se chromozom X ze *S. latifolia* v hybridu vůbec nepáruje, znemožnila prozatím potvrzení existence jeho homeologa u *S. viscosa*. Pro vyřešení této otázky bude třeba izolovat další pohlavně vázané markery, použitelné o obou druhů. Hybrid *S. latifolia* x *S. viscosa* bude nadále využíván také pro studium evoluce repetitivních DNA sekvencí.

Tento výzkum byl podporován Grantovou agenturou ČR (204/05/H505 a 521/05/2076).

ANALÝZA EXPRESE P53-SIGNÁLNÍCH GENŮ U MALIGNÍCH BLASTŮ PO PŮSOBNÍ METHOTREXÁTU

**EVA MICHALOVÁ^a, JAROSLAV ŠTĚRBA^{a,c}, SOŇA
BABČANOVÁ^a, KATEŘINA KRIVÁNKOVÁ^a,
DALIBOR VALÍK^b a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^b**

^aMasarykův onkologický ústav, Oddělení patologie, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno; ^bMasarykův onkologický ústav, Oddělení laboratorní medicíny, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno; ^cFakultní nemocnice Brno, Klinika dětské onkologie, Černopolní 9, 663 62 Brno

Methotrexát je nejčastěji používaným antifolátem při léčbě pacientů s akutní leukémií. Působí jako silný inhibitor enzymu dihydrofolátreduktasy podílejícího se na regulaci metabolismu folátů v buňce, což vede k celkovému snížení syntézy DNA. Vlastní mechanismus odpovědi leukemických

buněk na „high-dose“ terapii methotrexátem však není doposud zcela objasněn.

Z kostní dřeně pacientů s akutní leukémií byly izolovány naivní blasty a kultivovány s methotrexátem 24 hodin *ex vivo*. Byla provedena imunocytochemická analýza p53 a pomocí techniky cDNA GEArray byly sledovány změny exprese p53-signálních genů u pacientů trpících ALL a AML.

U všech pacientů bylo možné pozorovat zvýšenou expresi řady proapoptických genů např. BBC3 či BAX a naopak velmi nízkou hladinu, případně pokles exprese BCL2. U dané skupiny pacientů byla pozorována pouze bazální transkripční aktivita TP53 a ani vlivem methotrexátu se výrazně neměnila. Naproti tomu docházelo k významným změnám v expresi genu kódujícího protein MDM2 negativně regulující endogenní hladinu p53. Působením methotrexátu rostla u většiny pacientů exprese genů, jejichž produkty navozují zástavu buněčného cyklu: p21Waf1/Cip1, p16INK4 a MTBP. Ze skupiny genů kódujících produkty schopné modifikovat p53 byly prokázány vysoké hladiny exprese CSNK1A1, JNK2, SIRT1 či HIPK2. Změny exprese po vystavení buněk methotrexátu byly detekovány i u řady transkripčních faktorů či vazebných proteinů (SP1, p300). U každého pacienta byly zaznamenány výrazné změny exprese i u dalších genů, avšak tyto změny měly spíše individuální charakter.

Z výsledků studie vyplývá, že methotrexát navozuje u maligních blastů změny v expresi řady p53-signálních genů. Nicméně byla detekována značná míra variability v transkripční aktivitě jak při porovnání expresních profilů v rámci jednotlivých typů leukémie, tak i u pacientů se stejnou diagnózou. Přesto se podařilo nalézt několik kandidátních genů, které by mohly hrát významnou úlohu při objasnění mechanismu buněčné odpovědi na působení cytostatika.

Práce byla podpořena z finančních zdrojů IGA MZ ČR No. NR8338-3/2005 a MZO 000209805.

DEGENERACE NEURONÁLNÍCH BUNĚK HIPPOCAMPU PO PERINATÁLNÍ EXPOZICI ALKOHOLU

M. MILOTOVÁ

Fyziologický ústav 1.LF UK, Albertov 5, 128 00 Praha2

Experiment směřuje k objasnění vlivu ethanolu, jako neurotoxické látky, na vývoj populací neuronálních a gliálních buněk v hippocampu. Tato studie by mohla přispět k objasnění poškození mozku v perinatálním období.

V tomto experimentu jsme podávali 20 % roztok ethanolu, p.o., březím samicím laboratorních potkanů typu Wistar. Účinná látka byla aplikována denně, od prvního dne březosti (21 dnů) do odstavení mláďat (28.den). Mláďata tak byla vystavena prenatální i postnatální expozici ethanolu. 35. den postnatálního vývoje byla mláďata transaortálně perfundována (neutrálním roztokem paraformaldehydu) v hluboké thiopentalové narkóze, jejich mozky vyjmuty a zpracovány

na kryostatu. Následně byly řezy obarveny kombinací DNA barvení Hoechst (Sigma-Aldrich) a Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.). Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu AX 70 s epifluorescencí.

U zvířat, která byla transaortálně perfundována 35. den postnatálního vývoje, jsme se především zaměřili na morfolo- gické změny v oblastech hippocampu: CA1 a CA3 a na oblast dorzálního a ventrálního listu gyrus dentatus. Ve všech oblastech bylo možné pozorovat skupiny stále degenerujících buněk. Dále jsme tu identifikovali buňky s jemně granulovanými jádry a velké množství glií.

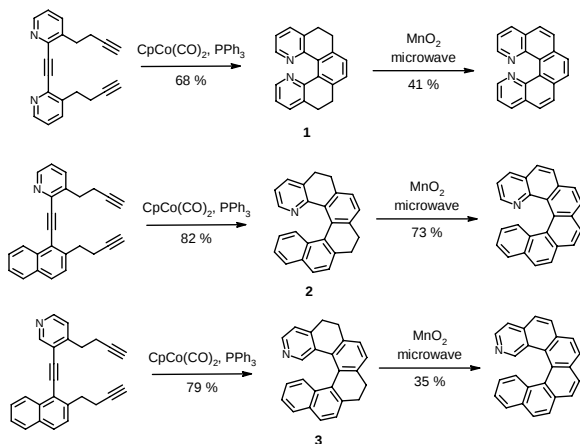
U 35-ti denních zvířat, která byla vystavena prenatalní a postnatální expozici 20 %-ního ethanolu, byly v CA1 a CA3 oblasti hippocampu a v obou listech gyrus dentatus jasně patrné morfolo- gické změny neuronálních a gliálních buněk. Pozoruhodné bylo zjištění, že i týden od poslední expozice alkoholu, zde bylo možné pozorovat ještě degenerující buňky, což svědčí o nastartování určitého procesu, pravděpodobně apoptózy. Apoptickému mechanismu zániku neuronálních a gliálních buněk by nasvědčovala i identifi- kace buněk s jemně segmentovanými jádry, což je jeden z hlavních znaků apoptózy. V ostatních oblastech hippocampu bylo také možné pozorovat morfolo- gické změny neuronálních a gliálních buněk.

SYNTHESIS OF FULLY AROMATIC AZAHELICENES

JIŘÍ MÍŠEK, FILIP TEPLÝ, IRENA G. STARÁ*, IVO STARÝ*, and DAVID ŠAMAN

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6
misek@uochb.cas.cz*

Azahelicenes and their derivatives have been rather rare although they might find interesting applications in various branches of chemistry. As the presence of nitrogen usually disqualifies the photodehydrocyclization approach^{1,2}, we have developed an alternative route using intramolecular [2+2+2] cycloisomerization³⁻⁵ of heteroaromatic triynes under Co(I) or Ni(0) catalysis.



Using this novel approach, we have prepared tetrahydroazahelicenes 1-3. For the final dehydrogenation step, routine methods have proved to be unsuccessful. Therefore, we have developed a new protocol based on microwave-assisted MnO_2 oxidation. It has provided a direct access to a series of fully aromatic azahelicenes.

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Reg. No. 203/06/1792), Ministry of Industry and Trade/Zentiva (Reg. No. FI-IM/073), and Ministry of Education, Youth and Sports (Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems, Reg. No. LC05A57).

LITERATURA

1. Murguly E., McDonald R., Branda N. R.: *Org. Lett.* 2, 3169 (2000).
2. Martin R. H., Deblecker M.: *Tetrahedron Lett.* 10, 3597 (1969).
3. Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšinský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 13, 2547 (2005).
4. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Vyskočil Š., Fiedler P.: *J. Org. Chem.* 68, 5193 (2003).
5. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulíšek L., Fiedler P.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9175 (2002).

OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA V LISTECH TABÁKU SE ZVÝŠENOU EXPRESÍ CYTOKININOXIDASY/DEHYDROGENASY BĚHEM STÁRNUTÍ

ZUZANA MÝTINOVÁ^{a,b}, NAĎA WILHELMOVÁ^b, VÁCLAV MOTYKA^c, DANIEL HASEL^b, JIŘÍ MALBECK^a a PETR DOBREV^c

^aUniverzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie rostlin, Albertov 6, 128 43 Praha 2; ^bÚstav experimentální botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6; ^cÚstav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 00 Praha 6 – Lysolaje

Během stárnutí se v buňkách tvoří reaktivní formy kyslíku (ROS-reactive oxygen species). Primárním zdrojem jejich produkce jsou chloroplasty, ve kterých jsou také viditelné první symptomy. Předpokládá se, že ROS významně přispívají k spuštění senescence, poslední fáze stárnutí. Tyto volné radikály napadají biomakromolekuly a tím ničí buněčné kompartmenty a způsobují tak oxidační stres a následné poškození. Udržení hladiny ROS je v rostlinách zajištěno prostřednictvím antioxidačního systému (enzymatického a neenzymatického). Senescence je také regulovaná fytohormony, např. cytokininy, které jsou považovány za inhibitory senescence. Jedna z možností regulace obsahu cytokininů je nevratná degradace katalyzovaná cytokininoxidasou / dehydrogenasou.

Sledovali jsme fotosyntetickou účinnost, oxidační poškození proteinů a antioxidační ochranu (enzymatickou i neenzymatickou) u listů transgenního tabáku se zvýšenou

expresí cytokininoxidasou/dehydrogenasou (CKX)1 s různým stářím. Transgenní rostliny vykazovaly zvýšenou aktivitu CKX a tudíž snížený obsah cytokininů. Nárůst aktivity CKX způsobil i změnu fenotypu. Rostliny byly nižší, keříčkovitého vzhledu, měly méně listů, ty byly menší a tlustší. Kořenový systém transgenních rostlin byl vyvinutější. Pomocí parametrů kinetiky fluorescence chlorofylu jsme zjistili, že fotosyntetický aparát transgenních rostlin v nejstarších listech byl mnohem méně poškozen ve srovnání s kontrolami. Obsah rozpustných proteinů byl ve starých listech vyšší než tomu bylo u kontrol a oxidační poškození těchto proteinů bylo nižší v celé rostlině. Transgenní rostliny vykazovaly vyšší obsah chlorofylu ve všech listových patrech. Antioxidační ochrana představovaná β -karotenem a xantofylovými pigmenty byla v transgenních rostlinách zvýšená. Nárůst aktivity glutathionreduktasy oproti kontrole byl pozorován v celé transgenní rostlině, aktivita superoxiddismutasy byla zvýšena jen v mladých listech, aktivita askorbatperoxidasy ve starých listech a aktivita katalasy byla v mladých listech snížena.

Přestože transgenní rostliny měly nižší obsah cytokininů, nebyly u nich pozorovány projevy senescence na rozdíl od kontrolních rostlin. Nelze tedy zcela vyloučit existenci vztahu mezi zvýšenou aktivitou CKX a lepší antioxidační obranou a ochranou fotosyntetického aparátu.

Tyto výsledky jsou součástí grantového projektu financovaného GA ČR (č. 522/03/0312 a č. 206/03/0313.)

LITERATURA

1. Werner T., Motyka V., Strand M., Schmölling T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98,10487 (2001).

IN VITRO INFLUENCE OF GLIVEC AND OTHER TYROSINE KINASE INHIBITORS ON PRIMARY CML CELLS

EVA OTÁHALOVÁ, HANA KLAMOVÁ, CEDRIK HAŠKOVEC, and JANA MORAVCOVÁ

*Institute of Hematology and Blood Transfusion,
U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic
eva.otahalova@uhkt.cz*

The first choice treatment of chronic myeloid leukemia (CML) is Glivec (imatinib mesylate, STI571). However, patients resistant to Glivec exist. The resistance can be caused by mutations in the ATP-binding site, BCR-ABL amplification, or involvement of other protein kinases who take over the role of BCR-ABL in the CML pathogenesis¹.

In our study we tested 40 CML patients before and during Glivec therapy (3–20 months after the first dose). Before the therapy we implemented an *in vitro* short term cultivation (24–48 hours) of the primary cells with Glivec (1 and 10 μ M) and other inhibitors of protein kinases. Namely we used PP2 (selective inhibition of Src family), Herbimycin A (inhibition of Src family, PDGF and c-ABL), JAK Inhibitor I (inhibition of JAKs), AG 490 (inhibition of JAK family and EGFR), Wortmannin (inhibition of PI3-kinase,

MAP kinases and PDGF) and PD 98059 (inhibition of MAP kinases). The effect of inhibitors was characterized by cell vitality monitoring, proliferation (expression of the proliferative marker Ki67) and expression of BCR-ABL and WT1 genes. Gene expression was measured by real-time RT-PCR. Protein levels were monitored by Western blotting.

According to the expression of WT1 after *in vitro* cultivation of primary cells with Glivec the monitored patients were divided into two groups:

1. RESPONDERS: In the case of 33 patients (83 %) the Glivec induction led to cell vitality deterioration, monitored genes down-regulation (to 30 % of the original expression in non-affected cells on average). All patients from this group clinically responded to Glivec therapy well. All of them reached complete hematologic response within 4 weeks after the first dose, 10 of them complete cytogenetic remission for the present.
2. NON-RESPONDERS: In the case of the 7 remnant monitored patients (17 %) only a slight gene down-regulation (to 90 % of the original expression in non-affected cells) was observed. The phenomenon of cell vitality deterioration and monitored genes down-regulation was here attained after cultivation with inhibitors of Src family kinases (PP2, Herbimycin A). These patients did not respond to Glivec therapy, 3 of them died so far. We observed increased number of BCR-ABL copies and accessory chromosomal changes.

Our results suggest that in some cases of Glivec resistant patients the role of BCR-ABL in the CML pathogenesis could be supplanted by Src kinases. Further monitoring of the involved patients is necessary to determine the suitability of this approach for clinical practice.

This study was supported by grant NR/8758 - 3 IGA MZCR.

REFERENCES

1. Donato N.J., Wu J.Y., Albitar M.: Blood 98, 770a (2001).

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NADPH-DEPENDENT PHENOL HYDROXYLASE FROM YEAST *CANDIDA TROPICALIS*

JAN PÁČA and MARIE STIBOROVÁ

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2
jan.paca@volny.cz*

Phenol is an aromatic pollutant present in wide variety wastewaters. *Candida tropicalis* can use phenol as the sole carbon and energy source. The first step of the aerobic degradation pathways of phenol in yeast involves its hydroxylation to catechol. Catechol can undergo fission either by an intradiol or an extradiol type of cleavage (*o*- or *m*-fission). There is very little known of the phenol-oxidizing enzymes in this microorganism. Cytosolic NADPH-dependent phenol 2-hydroxylase (EC 1.14.13.7) oxidizes phenol in various eukaryotic microorganisms. Here we proved, that this enzyme is responsible for the first step of

phenol degradation also in *C. tropicalis*. But information on this enzyme isolated from *C. tropicalis* is scarce.

We found that NADPH-dependent phenol hydroxylase is present in cytosolic subcellular fraction isolated from *C. tropicalis* grown on phenol as a carbon source. This enzyme is induced by phenol itself. The major metabolite formed from phenol by cytosolic NADPH-dependent phenolhydroxylase of *C. tropicalis* was characterized by UV/vis absorbance and mass spectroscopy as well as by the chromatographic properties on HPLC. The characteristics are identical to those of catechol. The enzyme was purified from the cytosolic fraction of *C. tropicalis* to homogeneity by the procedure consisting these steps: chromatography on DEAE-Sepharese, fractionation by polyethylene glycol 6000 and gel filtration on Sepharose 4B. NADPH-dependent phenolhydroxylase of *C. tropicalis* is a homotetramer having a molecular mass of 240 000. pH optimum of the enzyme lies at pH of 7.4-7.6. The results are the first report showing isolation and partial characterization of cytosolic NADPH-dependent phenol hydroxylase from yeast *C. tropicalis* capable of oxidation of phenol to catechol.

The work was financially supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant 303/05/2195).

tmRNA VE VÝVOJI STREPTOMYCET PRODUKUJÍCÍCH ANTIBIOTIKA

PETRA PALEČKOVÁ, JAN BOBEK, JÜRGEN
FELSBERG a KAREL MIKULÍK

MBÚ, AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4

Bakteriální tmRNA označovaná také jako SsrA, nebo 10Sa RNA má klíčovou úlohu v kontrole kvality proteosyntézy. Je to unikátní molekula s funkcí tRNA a mRNA v procesu označovaném jako *trans*-translace. Když ribosomy překládají 3' konec nekompletní mRNA nebo mRNA nemající stop kodon, na tRNA část tmRNA je přenesen alanin alanyl-tRNA synthetasou za vzniku alanyl-tmRNA. Alanin vstupuje do akceptorového(A) místa ribosomu, pak je spojen s nehotovým polypeptidovým řetězcem. To je signál pro translaci mRNA části tmRNA kodující specifický polypeptid, který rozeznává ATP-závislá proteinasa a pak je celý nehotový peptid degradován. Ribosomy jsou uvolněny z komplexu a mohou znovu vytvořit iniciační komplex. tmRNA kontrolní mechanismus nedegraduje pouze aberantní polypeptidy jednou vytvořené, ale brání vzniku aberantních polypeptidů rychlou eliminací poškozené mRNA. Bylo zjištěno, že funkční *trans*-translační systém je vyžadován pro přežití některých bakterií v přítomnosti antibiotik.

Dosud nebyla objasněna funkce tmRNA u streptomycet produkujících antibiotika interferující s proteosyntézou. Abychom objasnili význam tmRNA u producenta tetracyklinu *Streptomyces aureofaciens*, sledovali jsme rozdíly v hladinách tmRNA v průběhu vývoje buněk, které syntetizovaly tetracyklin a u buněk, kde změnou kultivačních podmínek tetracyklin nebyl produkován. Buňky produkující tetracyklin, dosahují maxima rychlosti proteosyntézy ve 24 h

kultivace. Zvýšení koncentrace tetracyklinu na 200 µg/ml je spojeno s rychlým poklesem rychlosti proteosyntézy; buňky akumulují ribosomální podjednotky a hladina tmRNA vzrůstá až do 48 h kultivace. Buňky, které neprodukují tetracyklin mají hladinu tmRNA o 30 % nižší, maximum rychlosti proteosyntézy je dosaženo ve 32 h (je asi o 40 % nižší než maximum u buněk syntetizujících tetracyklin) a nedochází k akumulaci ribosomálních podjednotek. Je známo, že tetracyklin interferuje s vazbou aminoacyl-tRNA na A-místo ribosomu. Zjistili jsme, že akumulace tetracyklinu je spojena i se zvýšením rychlosti syntézy ppGpp. Obsazení A-místa vede k poklesu syntézy stabilní RNA a tím lze vysvětlit i redukcí rychlosti translace o 80 % v pozdější fázi vývoje kultury, kdy dosahuje produkce tetracyklinu až 2000 µg/ml. Nadprodukce tetracyklinu vede ke vzniku tetracyklin-ribosomálních agregátů, které rychle sedimentují a jsou neaktivní při translaci. Naše výsledky nasvědčují, že vzrůst hladiny tmRNA v počátečních fázích biosyntézy tetracyklinu je spojen s uvolňováním ribosomů z aberantních komplexů. Sledovali jsme účinek subletálních koncentrací kiromycinu, chloramfenikolu, streptomycinu a tetracyklinu na hladinu tmRNA u *S. aureofaciens*. Zjistili jsme, že uvedená antibiotika zvyšují hladinu tmRNA. Streptomycety jsou půdní mikroorganismy, které jsou vystaveny různým změnám prostředí vyvolávající stres. My jsme sledovali účinek chladového a teplotního šoku na hladinu tmRNA. Zjistili jsme, že pokles teploty z 28 °C na 12 °C stimuluje maturaci prekursorové tmRNA a zvyšuje hladinu funkčně aktivní tmRNA. Teplotní šok z 28 °C na 37 °C vedl k výraznému poklesu tmRNA. Výsledky našich experimentů prokázaly, že *trans*-translační systém je důležitou součástí mechanismů umožňující přežití mikroorganismů ve stresových podmínkách.

VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ KADMIA NA MATURACI SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU

JIRÍ PETŘEK^a, DANIELA ŠIGUTOVÁ^a, JAN
VÍTEČEK^a, JITKA PETRLOVÁ^b, LADISLAV
HAVEL^a, JIRÍ BALOUN^a, VOJTĚCH ADAM^{b,c}
a RENÉ KIZEK^b

^aÚstav biologie rostlin, ^bÚstav chemie a biochemie,
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1,
613 00 Brno, ^cKatedra analytické chemie, Přírodovědecká
fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
j.petrek@email.cz, kizek@sci.muni.cz

Somatická embryogeneze se stala velmi významnou metodou pro rychlé množení jehličnatých i listnatých stromů *in vitro*; umožňuje během krátkého časového období produkovat velká množství identických rostlin z malých explantátů. Celý proces somatické embryogeneze probíhá na živných médiích v laboratorních podmínkách a značně se podobá procesu vytváření zygotických embryí v semenech na stromech, zejména u konifer¹. Celý proces od odvození embryonální kultury až po získání nových rostlin lze rozdělit do několika fází: indukce, proliferace a multiplikace základních embryonálních struktur (proembrya, raná

somatická embrya), maturace somatických embryí (SE) za pomoci abscisové kyseliny (ABA), desikace zralých SE, konverze desikovaných SE v rostlinky ("klíčení") a růst prvních jehlic, a nakonec převedení vyvinutých rostlinek do substrátu. Mezi takto vzniklými zárodky a zárodky zygotickými neexistuje výrazný rozdíl; právě pro tuto jejich podobnost můžeme kultury somatických embryí využít jako modelové kultury pro sledování vlivu těžkých kovů na embryogenezi.

V naší práci jsme studovali, jaký vliv má těžký kov (kadmium) na průběh maturace somatických embryí smrku. Sledovali jsme růst a životnost kultury, množství vytvořených zralých somatických embryí a také obsah thiolových sloučenin (glutathion a phytochelatiny), kterými se kultura brání proti působení těžkých kovů. Použili jsme tři různé koncentrace kadmia (50, 250 a 500 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) a získané výsledky porovnali s variantou bez těžkého kovu. Pro experimenty byla vybrána kultura raných somatických embryí (RSE) smrku pichlavého^{2,3}. Pro stanovení růstu kultur byla využita optimalizovaná metoda analýzy obrazu. Ke stanovení životnosti buněk jsme využili tzv. „test dvojitého barvení“ založený na selektivní permeabilitě cytoplasmatické membrány. Kromě základních biologických parametrů (růst a životnost) byl zkoumán vliv kadmia na schopnost tvořit maturující (zrající) SE. Ze zjištěných poznatků jasně vyplynulo, že kadmium inhibuje tvorbu zralých SE. V průběhu experimentu byla dále sledována aktivita intracelulárních esteráz, kterou lze v tomto případě využít jako další marker životnosti buněk, a množství vytvořených obranných látek (thiolových sloučenin – glutathion, phytochelatiny), jejichž syntézou se rostliny intenzivně brání proti působení těžkých kovů. Výsledná aktivita intracelulárních esteráz byla v korelaci s tvorbou thiolových sloučenin a klesala do čtvrtého týdne kultivace, poté naopak rostla, což souvisí s dozráváním SE⁴.

Práce na tomto projektu byla podporována grantem: GA ČR 525/04/P132.

LITERATURA

- Petrek J., Vitecek J., Vlasinova H., Kizek R., Kramer K. J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: Anal. Bioanal. Chem. 383, 576 (2005).
- Petrek J., Vacek J., Kizek R., Vitecek J., Havel L.: Acta Phys. Plantarum 26, 207 (2004).
- Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: Bioelectrochemistry 63, 347 (2004).
- Vitecek J., Adam V., Petrek J., Babula P., Novotna P., Kizek R., Havel J.: Chem. Listy 99, 496 (2005).

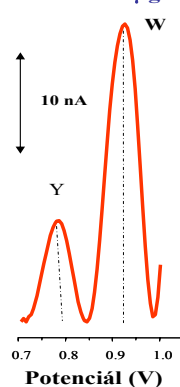
STUDIUM AVIDINU/STREPTAVIDINU V GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ROSTLINÁCH POMOCÍ VOLTAMETRICKÝCH A AMPEROMETRICKÝCH TECHNIK

JITKA PETRLOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}, LADISLAV HAVEL^c, KARL J. KRAMER^d a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, ^cÚstav biologie rostlin, MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie, Masarykova univerzita, PřF, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR, ^dGrain Marketing and Production Res. Ctr., Agricultural Res. Service, US Dept of Agriculture, Manhattan, KS 66502, USA
jitap@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

Zabezpečení potravinářských surovin pro stále expandující lidskou populaci je hlavním cílem Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO). K dosažení tohoto cíle je nezbytné využít nových biotechnologických postupů. Navíc sledování kvality potravin je významnou prioritou Evropské unie a moderního potravinářského průmyslu. Pro výživu je využíváno několik málo rostlinných druhů, jako například ječmen (*Hordeum vulgare*), rýže (*Oryza sativa*),

Avidin 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



slunečnice (*Helianthus annuus*), pšenice (*Triticum aestivum*) a kukuřice (*Zea mays*). Všechny tyto výše jmenované rostliny jsou předmětem zájmu genetických modifikací (GMO) za účelem získání výhodné vlastnosti. Je známo, že produkce kvalitních potravin je velmi často potlačena působením škodlivého a nežádoucího hmyzu^{1,2}. Nedávno se zjistilo, že avidin je toxický pro široké spektrum škůdců (motýly, brouci, a dvoukřídly hmyz). Z tohoto důvodu byl gen pro avidin přenesen do rostlin kukuřice. GMO kukuřice exprimují dobře avidin, avšak

studium intenzity exprese v různých pletivech rostliny je stále velmi obtížné. Z těchto důvodů je nezbytné vyvinout specifické a jednoduché postupy pro detekci a kvantifikaci avidinu/streptavidinu v rostlinách. Navíc zvýšená poptávka a produkce o geneticky modifikovanými druhy rostlin přináší potřebu informovat zákazníka. Velmi vhodným nástrojem studia exprese avidinu mohou být elektrochemické senzory. V naší práci bylo elektrochemické měření provedeno na analyzátoru Autolab. Systém elektrod byl složen z uhlíkové pastové pracovní elektrody, Ag/AgCl/3 M KCl referenční elektrody a platinový drátke pomocné elektrody. Acetátový pufr (0,1 M CH_3COOH + 0,1 M CH_3COONa , pH 4,0) byl použit jako základní elektrolyt. Parametry pro adsorptivní transferové rozpouštěcí square wave voltametrii (AdTS SWV) byly následující: iniciační potenciál = 0,1 V, a potenciál = 1,3 V, amplituda = 25 mV, step potenciál = 5 mV, a frekvence = 200 Hz. Elektroanalytické stanovení umožnilo ultrasenzitivní analýzu avidin/streptavidinu v koncentraci nižší než 0,7 fM (3,2 zmol v 5 μl kapce) a 174 nM v extraktu semen transgenické kukuřice. Námi vypracovaná elektrochemická metoda byla dále využita pro stanovení avidinu i u jiných GMO (rýže a rostlina bramboru). Dále byla tato metoda ověřena při stanovení avidinu v několika rozdílných kukuřičných produktech dostupných v obchodní síti.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132.

LITERATURA

1. Kizek R., Masarik M., Kramer K. J., Potesil D., Bailey M., Howard J. A., Klejdus B., Mikelova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F.: *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 1167 (2005).
2. Masarik M., Kizek R., Kramer K. J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* **75**, 2663 (2003).

AlQ₃ KOMPLEXY S KONJUGOVANÝMI CHROMOFORY – PŘÍPRAVA, VLASTNOSTI A APLIKACE

RADEK POHL^a a PAVEL ANZENBACHER Jr.^b

^aÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bCenter for Photochemical Sciences, Bowling Green State, University, Bowling Green, Ohio 43403, USA
pohl@uochb.cas.cz

Organické světlo emitující diody (OLEDy)¹ jsou zdroje světla různých vlnových délek pracující na principu elektroluminiscence pocházející z organické sloučeniny. Organickou sloučeninou může pak být jak nízkomolekulární látka – nejčastěji koordinační sloučenina nebo konjugovaný polymer. OLEDy jsou technologií budoucnosti² pro displeje, elektronický papír a různá další zobrazovací zařízení, protože mají oproti klasickým CRT obrazovkám nebo LCD displejům řadu předností, zejména malou spotřebu energie, vysoké rozlišení a kontrast. Jejich další důležitou předností je fakt, že jsou konstrukčně velmi tenké a ohebné.

Tato práce se zabývá laděním optických vlastností, zejména barvy emise, v aluminum tris(8-hydroxy-chinolinolátu) (AlQ₃). AlQ₃ byl jednou z prvních sloučenin, u kterých byla zjištěna elektroluminiscence při nízkém napětí³. V naší studii jsme ladili energetický rozdíl HOMO-LUMO v 8-hydroxy-chinolinolátovém ligandu připojením elektronově chudých nebo elektronově bohatých aromatických nebo heteroaromatických konjugovaných substituentů^{4,5} v poloze 5. U připravených sloučenin byly studovány jejich optické vlastnosti, především vlnová délka emise a kvantový výtěžek. Byla také studována elektroluminiscence OLEDů zkonstruovaných z připravených sloučenin⁶.

LITERATURA

1. Kelly S. M.: *Flat Panel Displays: Advanced Organic Materials*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2000.
2. Felton M. J.: *Today's Chemist at Work* **10**, 30 (2001).
3. Tang C. W., VanSlyke S. A.: *Appl. Phys. Lett.* **51**, 913 (1987).
4. Pohl R., Anzenbacher P. Jr.: *Org. Lett.* **5**, 2769 (2003).
5. Pohl R., Montes V. A., Shinar J., Anzenbacher P. Jr.: *J. Org. Chem.* **69**, 1723 (2004).
6. Montes V. A., Li G., Pohl R., Shinar J., Anzenbacher P. Jr.: *Adv. Mater.* **16**, 2001 (2004).

AMPHIPHILIC CALIX[4]ARENES: IMPORTANT FACTORS FOR COMPLEXATION OF SMALL MOLECULES

MICHAELA POJAROVA^{a,b}, GENNADY A. ANANCHENKO^a, KONSTANTIN A. UDACHIN^a, JOHN A. RIPMEESTER^a, ANTHONY W. COLEMAN^c, and IVAN STIBOR^b

^aNRC Steacie Institute for Molecular Sciences, National Research Council Canada, Sussex Dr. 100, K1A 0R6 Ottawa, Ontario, Canada; ^bDepart Org. Chem., VSCHT, Technická 5, 166 00 Prague 6, Czech Republic; ^cInstitut de Chimie et Biologie des Proteins, Lyon Cedex, France

Calix[n]arenes represent a promising group of compounds which can be used for complexation of a variety of substances and these abilities can be improved by chemical modification of the host. The Friedel-Crafts acylation of the upper rim provides easy access to the so-called amphiphilic calix[n]arenes which are still able to complex small molecules and also to self-organize into solid lipid nanoparticles in water to serve as prospective carrier systems. In this work we studied the main factors leading to the formation of different types of inclusion complexes with various guest molecules, such as TEMPO¹, stilbene², dibenzylketone³, THF or dioxane⁴. The crystalline inclusion complexes were isolated from the solutions of calixarenes in liquid guest or in ethanol in the presence of guests and they were characterized by ¹³C CP-MAS NMR, TGA, DSC, powder and single-crystal XRD. It was found that the important factor for the complexation of small molecules is the length of the acyl chain and the presence of carbonyl group. The latter fixes the position of first two carbon atoms of acyl arm in the plane with phenyl ring and therefore improves the guest access to the calixarene pocket for the case of *p*-hexanoyl calix[4]arene. However, the increasing arm length diminishes the accessibility of the cavity due to strong van der Waals interactions with acyl arms of neighboring calixarenes in crystal lattice. Therefore, the higher calixarenes (starting with *p*-dodecanoyl) can build only self-included complexes where acyl arm of one molecule is included into the cavity of another molecule. In comparison to the *p*-acyl calix[4]arenes the *p*-*n*-alkyl calix[4]arenes can form only self-included complexes due to the absence of “directing” effect of C=O group.

This work was supported in part by the CNRS-NRC collaborative program.

REFERENCES

1. Ananchenko G. S., Pojarova M., Udachin K. A., Leek D. M., Coleman A. W., Ripmeester J. A.: *Chem. Commun.* **2006**, 386.
2. Ananchenko G. S., Udachin K. A., Ripmeester J. A., Jebors S., Shalgaldian P., Coleman A. W.: *Chem. Eur. J.* **12**, 2441 (2006).
3. Ananchenko G. S., Udachin K. A., Pojarova M., Dubes A., Ripmeester J. A., Perrier T., Coleman A. W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1585 (2006).

4. Ananchenko G. S., Udachin K. A., Pojarova M., Dubes A., Ripmeester J. A., Jebors S., Coleman A. W.: J. Am. Chem. Soc., submitted

THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE BINDS COVALENTLY TO DNA AFTER ITS ACTIVATION BY PEROXIDASES

JITKA POLJAKOVÁ^a, TOMÁŠ ECKSCHLAGER^b, EVA FREI^c, and MARIE STIBOROVÁ^a

^aDept Biochem., Fac. Sci., Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; ^bClin. Paed. Haematol. Oncol., 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Úvalu 84, 150 00 Prague 5; ^cDept Mol. Toxicol., German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany

Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation, inhibition of topoisomerase II and cytochrome P450 (CYP)-mediated formation of covalent DNA adducts. This agent and some its derivatives are used in the therapy of breast cancer and leukemia. This is the first report on the molecular mechanism of ellipticine oxidation by peroxidases (human myeloperoxidase, human and ovine cyclooxygenases, bovine lactoperoxidase, horseradish peroxidase) to species forming ellipticine-DNA adducts. The enzymatic systems present in the tumor cells mediate the activation of the antineoplastic agents to form two ellipticine-derived DNA adducts. Using NMR spectroscopy, the structures of two ellipticine metabolites were identified; the major product is the ellipticine dimer, in which the two ellipticine skeletons are connected via N6 of the pyrrole ring of one ellipticine molecule and C9 in the second one. The minor metabolite is ellipticine N2-oxide. Using ³²P postlabeling and [³H]-labeled ellipticine, we showed that ellipticine binds covalently to DNA after its activation by peroxidases. The DNA adduct pattern induced by ellipticine consisted of a cluster of up to four adducts. The two adducts are indistinguishable from the two major adducts generated between deoxyguanosine in DNA and either 13-hydroxy- or 12-hydroxyellipticine or in rats treated with ellipticine, or if ellipticine was activated with human hepatic and renal microsomes. The results presented here are the first characterization of the peroxidase-mediated oxidative metabolites of ellipticine and we have proposed species, two carbenium ions, ellipticine-13-ylum and ellipticine-12-ylum, as reactive species generating two major DNA adducts seen in vivo in rats treated with ellipticine.

Activation of ellipticine to a DNA binding species by peroxidases is an interesting finding in view of the compound's activity against human leukemia and other tumors like neuroblastoma cancer. The results obtained in this study might, moreover, be employed for development of new drugs utilizing in gene therapy and for tumor targeting.

Supported by the GACR (203/06/0329) and Ministry of Education of CR (grant MSM0021620813).

REFERENCES

1. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: Int. J. Cancer 107, 885 (2003).
2. Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: Cancer Res. 64, 8374 (2004).

SLEDOVÁNÍ RŮSTU CÉVNÍCH ENDOTHELIÁLNÍCH BUNĚK NA FIBRINOVÝCH VRSTVÁCH

TOMÁŠ RIEDEL, EDUARD BRYNDA, JAN EVANGELISTA DYR, ELENA FILOVÁ, JAROSLAV CHLUPÁČ a LUCIE BAČÁKOVÁ

Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2; Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6; Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4

Poškozené cévy jsou běžně přemostěny syntetickými cévními protézami. Trombogenita povrchu může vést k ucpání protéz, obzvláště u protéz s malým průměrem. Povrchové modifikace, včetně osazení endoteliálními buňkami (EC), jsou prováděny pro zlepšení hemokompatibility. Fibrinové sítě se používají k utěsnění pletených cévních protéz aby se zabránilo krvácení. Fibrin současně vylepšuje adhezi a růst EC na cévních protézách¹.

V naší studii jsme kultivovali cévní endoteliální buňky na upraveném polystyrénovém povrchu dvourozměrnými fibrinovými strukturami (2DFb) a trojrozměrnými fibrinovými sítěmi (3DFb). 2DFb struktury byli připraveny opakovaným měněním roztoků fibrinogenu, trombinu a inhibitorů trombinu D-phenylalaninyl-L-prolyl-L-argininyl chloromethylketonu (PPACK) a hirudin. Různé typy fibrinových struktur jsme získali použitím různých koncentrací fibrinogenu v roztoku. 3DFb sítě na povrchu jsme připravili po adsorpci fibrinogenu, následné aktivaci trombinem a přidáním roztoku fibrinogenu s antithrombinem III a heparinem. 3DFb sítě v objemu jsme připravili nárůstem fibrinové sítě od povrchu bez použití inhibitorů trombinu. Morfologii fibrinových struktur a sítí jsme pozorovali transmisním elektronovým mikroskopem.

Kultivační médium bylo obohaceno aprotininem, inhibitorem fibrinolýzy. Čistý polystyrénový povrch bez předchozí úpravy byl použit jako kontrolní vzorek. V porovnání s tímto vzorkem bylo množství endoteliálních buněk 1 den po nasazení u všech vzorků vyšší. Nejsignifikantnější rozdíly v počtu buněk byly u objemových 3DFb vzorků, nicméně buňky na 2DFb lépe proliferovaly a po 7 dnech kultivace byl jejich počet stejný nebo u některých vzorků dokonce vyšší než u prostorových sítí. Imunocytochemické barvení alfa-v integrinu, který zprostředkovává interakci EC s fibrinogenem², a vinkulinu ukázalo dobře vyvinuté fokální adhezní plaky na EC rostoucích na všech fibrinových vrstvách. Většina EC byla pozitivně značena na přítomnost von Willebrandova faktoru,

důležitého markeru diferenciace EC. Z těchto výsledků lze usuzovat, že chování buněk lze regulovat různou strukturou fibrinových sítí připevněných k povrchu.

Modifikace umělých cévních protéz těmito fibrinovými strukturami s případnou pre-kultivací EC na povrchu, by mohla být aplikována na cévních protézách před jejich zavedením do pacientova organismu.

LITERATURA

1. Cardon A., Chakfe N., Thaveau F., Gagnon E., Hartung O., Aillet S., Kerdiles Y., Dion Y.M., Kretz J.G., Doillon C.J.: *Ann. Vasc. Surg.* 14, 543 (2000).
2. Chen Yi-Ping, O'Toole T.E., Leong L., Liu B.Q., Diazgonzaes F., Ginsberg M.H.: *Blood* 86, 2606 (1995).

NIKOTIN ZMÍRNÍ DEGENERACI NEURONŮ HIPPOCAMPU VYVOLANOU PODÁNÍM KAINÁTU

V. RILJAK

Fyziologický ústav 1. LF UK, Albertov 5, 128 00 Praha 2

Aplikace kainátu, analogu glutamátu, je celosvětově užívaný experimentální model lidské temporální epilepsie. Na experimentálních modelech řady jiných chorob (Parkinsonova choroba apod.) bylo prokázáno, že nikotin má nebo by mohl mít protektivní a léčebný potenciál. Tato látka je v posledních letech intenzivně studována, neboť její použití při terapii zmíněných chorob se zdá velmi slibné.

Cílem této práce bylo objasnit, zda centrální nervový systém (především hippocampus), projeví mírnější degenerativní změny v případě, že bude zvířatům před podáním kainátu aplikován nikotin.

Experiment byl prováděn na laboratorních potkanech kmene Wistar, stáří 35 dní. První skupině byl podán nikotin (Sigma) i.p. v dávce 1mg/kg. Druhé skupině byl podán kainát (Sigma) 10mg/kg. Třetí skupině byl podán nikotin i.p. v dávce 1mg/kg a následně jim byl po 30 minutách podán kainát 10mg/kg (konvulsivní dávka). Čtvrté skupině byl podán fyziologický roztok v objemech odpovídajících látkám účinným. Dva dny po aplikaci byla zvířata transkardiálně perfundována neutrálním paraformaldehydem, jejich mozky obarveny jednak kombinací barvení Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc.) a Hoechst (Sigma-Aldrich) (vyhodnocení rozsahu neurodegenerace) a jednak byly barveny na NADPH-diaforázu (NADPH-d), ke kvantifikaci nitroergního systému CNS.

Hippocampus zvířat, jimž byl před aplikací kainátu podán nikotin, vykazoval výrazně mírnější degenerativní změny, než hippocampus zvířat, kterým byl podán pouze kainát. Méně postiženy byly především oblasti CA1 a CA3 hippocampu. Kvantifikace NADPH-d pozitivních buněk ukázala signifikantní nárůst jejich hustoty po aplikaci nikotinu a jejich výrazný úbytek po aplikaci kainátu. U skupiny, které byly podány obě látky došlo k signifikantnímu nárůstu hustoty NADPH-d pozitivních buněk v CA1 oblasti hippocampu.

Zjištěný úbytek hustoty NADPH-d pozitivních buněk u zvířat, kterým byl podán pouze kainát, je zřejmě způsoben excitotoxickými vlastnostmi kainátu, které mohou vyvolat zánik nervových buněk. Vzestup hustoty NADPH-d pozitivních buněk u skupiny, které byl podán pouze nikotin, je možno vysvětlit změnou genové exprese nitric oxid syntázy a následným vzestupem rezistence CNS k další noxe (v našem případě kainátu). NADPH-d pozitivní buňky byly v řadě studií popsány jako relativně rezistentnější ve srovnání s populacemi jinými.

A NOVEL SELF-PROCESSING MODULE DERIVED FROM THE FRPC PROTEIN OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* FOR A SINGLE-STEP PURIFICATION OF FREE RECOMBINANT PROTEINS

LENKA SADÍLKOVÁ, RADIM OSIČKA, KATEŘINA PROCHÁZKOVÁ, IRENA LINHARTOVÁ, and PETER ŠEBO

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4

Purification of recombinant proteins to homogeneity is often a challenging process and typically requires several chromatographic steps that must be individually optimized for each protein of interest. To overcome this difficulty, a system that enables purification of free recombinant proteins in a single affinity chromatographic step has been developed. The system is based on a 250 amino acid residues long self-processing module of the FrpC protein of *Neisseria meningitidis* that is genetically fused at its C-terminus to an affinity tag enabling simple one-step purification and at its N-terminus to a protein of interest. Upon binding of the fusion protein to an affinity matrix and washing out of contaminating proteins, specific cleavage between amino acid residues Asp and Pro of the self-processing module is induced by calcium ions. This results in release of the free protein of interest, having only one extra amino acid residue (Asp) at its C-terminus. The self-processing module - affinity tag fusion partner remains trapped on the affinity matrix. This system has been successfully tested with several proteins of interest (adenylate cyclase, chloramphenicol acetyltransferase, β -galactosidase, maltose-binding protein, or glutathione-S-transferase) and two different affinity tags (chitin-binding domain, or poly-His).

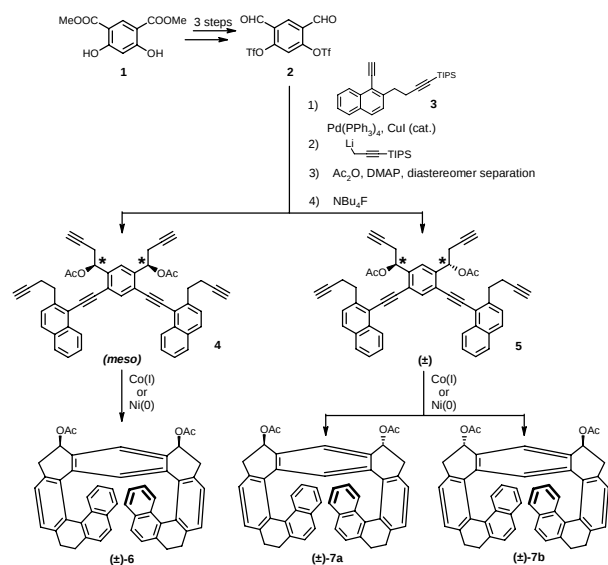
MODULAR SYNTHESIS OF FUNCTIONALISED [11]HELICENE-LIKE MOLECULES

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

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

We have developed a novel approach to higher functionalised helical scaffolds¹ utilizing double [2+2+2] cycloisomerization^{2,3} of aromatic molecules containing six acetylene units mediated by Co(I) and Ni(0) complexes.

The synthesis utilises building block **2** readily available from the known diester **1**. Further 3 synthetic steps provide a 1:1 mixture of diastereoisomeric diacetates easily separable by column chromatography. Desilylation gives the key hexaynes **4** and **5**, respectively. Achiral hexayne **4** cyclises to a racemate of helical compound **6**. Hexayne **5** is itself a *d,l*-pair and its cyclisation leads to a preferential formation of one of the two possible diastereoisomeric helical compounds **7a** or **7b** with up to 85:15 selectivity. Further synthetic modifications of the helical diacetates are in progress.



Supported by the Grant Agency of CR (No. 203/06/1792), Ministry of Industry and Trade/Zentiva (No. FI-IM/073), and Ministry of Education, Youth and Sports (Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems, No. LC05A57).

LITERATURA

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

FUNKČNÍ ANALÝZA MUTACÍ V GENU BRCA1: HIT & FIX METODA

EVA SCHOLZOVÁ a ZDENĚK KLEIBL

Ústav Biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK,
U Nemocnice 5, 128 53 Praha 2

Mutace v genu BRCA1 (Breast Cancer 1; OMIM 113705) jsou zodpovědné za více jak 90 % dědičných karcinomů prsu a/nebo ovária. Funkční charakteristika mutací odhalených během screeningu ohrožené populace žen¹ je nutná k přesnému posouzení rizika vzniku nádoru. Metody funkční analýzy mutovaného genu zvýšením jeho exprese za použití konvenčních plazmidů neumožňují rekapitulaci fyziologických regulací *in vivo* a ve svém důsledku mohou vést k zavádějícím výsledkům.

Konstrukce mutací v systému BAC (Bacterial Artificial Chromosome) zaručuje expresi zvoleného genu ve fyziologických hladinách a se zachováním *in vivo* regulací. Společně s metodou RNA interference tvoří versatilní systém umožňující funkční analýzu mutací v genu BRCA1.

Na základě výsledků mutační analýzy populace žen ohrožených dědičným karcinomem prsu/ovária jsme vybrali mutace v genu BRCA1 (c.181T>G, c.1747A>T, c.3700_3704del5, c.5266dupC) pro funkční analýzu. Konstrukce mutací v BAC byla zprostředkována rekombinačním systémem bakteriofága λ . Pomocí tzv. „hit & fix“ metody² bylo možné efektivně získat i BAC s tak jasnými mutacemi v genu BRCA1, které jsme pro funkční analýzu vybrali.

V prvním kroku se zamění v BAC cca 20 nukleotidů wild-type (wt) BRCA1 sekvence v okolí báze, kde se nachází daná mutace. K tomuto účelu se do bakterií vpraví denaturovaná lineární DNA, která je na obou koncích homologní k wt BRCA1 sekvenci alespoň v délce 80 nukleotidů a aktivuje se rekombinací. Po selekci pozitivních klonů jsou v druhém kroku tyto nukleotidy stejným postupem přeměněny zpět na originální sekvenci a současně je vpravena žádaná mutace. Jelikož je v každém kroku změněno více nukleotidů (cca 20), screening pomocí specifické PCR nebo hybridizace je velmi efektivní.

Otestovali jsme několik shRNA specifických proti genu BRCA1 a vytvořili klony buněčných linií karcinomu prsu exprimující tyto shRNA a snižující selektivně expresi wt BRCA1 mRNA. Klony s odstupňovanou expresí wt BRCA1 budou použity pro transfekci BAC nesoucího vybranou mutaci v BRCA1 genu a následnou funkční analýzu závislosti exprese mutované a wt BRCA1 formy *in vitro* v buněčných liniích karcinomu prsu.

Zavedení a optimalizace BAC/RNAi systému pro studium funkčních vlastností mutací v genu BRCA1 bude nadále využíváno pro funkční analýzu mutací v BRCA1 genu a odhad rizika vzniku karcinomu prsu/ovária u nosiček těchto mutací.

Projekt výzkumu byl podporován grantem IGA č. NR/8345-4.

LITERATURA

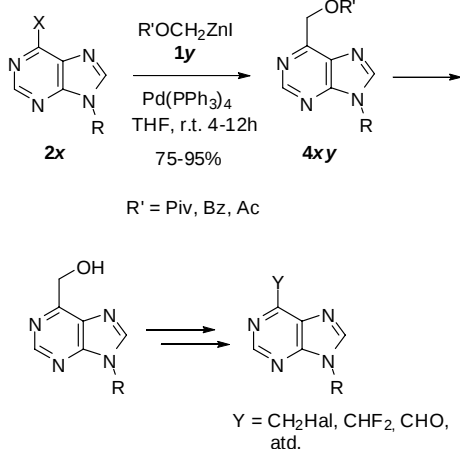
1. Pohlreich P., Zikan M., Stribrna J., Kleibl Z., Janatova M., Kotlas J., Zidovska J., Novotny J., Petruzalka L., Szabo C., Matous B.: Breast Cancer Res. 7, R728 (2005).
2. Yang Y., Sharan S.K.: Nucleic Acids Res. 31, e80 (2003).

SYNTÉZA A TRANSFORMÁCIE (HYDROXYMETYL)PURÍNŮV

PETER ŠILHÁR a MICHAL HOCEK

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

6-Hydroxymetyl-9-(β-D-ribofuranosyl)purín, izolovaný z peniazovky škvrnitej (*Collybia maculata*), sa vyznačuje antifungálnymi, cytotoxickými a antivirálnymi (vesicular stomatitis virus) vlastnosťami. Hydroxymetylová skupina je navyše výhodná na ďalšie funkčné transformácie, čím sa otvára cesta k novým modifikovaným purínom nesúcich funkcionalizované substituenty.



Na základe týchto skutočností sme sa snažili vyvinúť novú, lepšiu metodiku na prípravu (hydroxymetyl)purínov. Uspeli sme použitím acyloxymetylzinku iodidov **1y** v Negishiho Pd-katalyzovaných cross-coupling reakciách s príslušnými 6-halogenpurínmi **2x**. Spomenuté reakcie prebiehali hladko pri laboratórnej teplote za vzniku 6-(acyloxymetyl)purínov **4xy** vo veľmi dobrých výťažkoch. Pripravený 6-(hydroxymetyl-9-(β-D-ribofuranosyl)purín vykazuje vysokú cytostatickú aktivitu (IC₅₀=10 nM) a značný inhibičný efekt voči adenosín deamináze. Touto novou metódou je možné pripraviť 6-(hydroxymetyl), resp. 2-amino-6-(hydroxymetyl)purínové bázy a nukleozidy v dvoch až troch krokoch s dobrým celkovým výťažkom.

Z doterajšieho výskumu regioselektivity týchto reakcií s 2,6-dihalogenpurínmi je zrejmé, že 6-(acyloxymetyl)-2-chlorpuríny, resp. 2-(acyloxymetyl)-6-chlorpuríny je možné pripraviť s vysokou regioselektivitou vo veľmi dobrom výťažku, čím sa otvára cesta prípravy 2,6-disubstituovaných purínov s rozdielnymi substituentami.

Ďalšie funkčné transformácie hydroxylovej skupiny, ako napríklad halogenácie, oxidácie a na ne nadväzujúce reakcie boli a sú predmetom nášho výskumu, ktorého výsledky budú tiež prezentované.

Táto práca je časťou výskumného projektu Z4 055 0506, ktorý bol podporovaný MŠMT "Centrum Nová antivirologia

a antineoplastika" 1M0508 a firmou Sumitomo Chemical, Co. (Osaka, Japan). Autori ďakujú Dr. Votrubovi za testovanie pripravených zlúčenín na cytostatickú aktivitu a inhibíciu adenosín deaminázy a Dr. Pohlovi za NMR spektra.

CHARAKTERIZACE NOVÉ BUNĚČNÉ LINIE EM-G3 Z KARCINOMU PRSU POMOCÍ DVOJROZMĚRNÉ ELEKTROFORÉZY A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

KATEŘINA SMUTNÁ^{a,b}, IRENA SELICHAROVÁ^a,
KAREL UBIK^a, EVA MATOUŠKOVÁ^c, MARKÉTA
BROŽOVÁ^c a JIŘÍ JIRÁČEK^a

^aÚstav organickej chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2,
166 10 Praha 6; ^bKatedra biochemie PŘF UK, Hlavova 8,
128 40 Praha 2; ^cÚstav molekulární genetiky AV ČR,
Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
smutna@uochb.cas.cz

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem u žen. Ani přes neustálý rozvoj léčebných metod však nedošlo prozatím k zásadnímu zlomu v léčebných výsledcích. Ke studiu nádorů jsou v současné době využívány klasické proteomické postupy. Cílem proteomických analýz je často nalezení specifických proteinových markerů, které by mohly pomoci stanovit včasnou diagnózu a určit individuální léčbu pro pacientky s karcinomem prsu.

Proteomické studie karcinomu za pomoci dvojrozměrné elektroforézy mohou být prováděny buď přímo z nádorových biopsií, anebo srovnáváním buněčných kultur vypěstovaných z nádorových buněk. Model buněčných kultur je považován za výhodnější, protože současnými metodami nelze zcela věrohodně analyzovat tak komplexní materiál, jakým jsou biopsie.

V našem případě se podařilo získat zcela novou buněčnou linii EM-G3, izolovanou z primárního ductálního karcinomu prsu. Cílem této studie bylo porovnat proteinové složení této nové linie s proteiny z buněčné kultury vypěstované ze zdravé prsní tkáně (NME - normal mammary epithelia).

Proteiny extrahované z buněk byly analyzovány pomocí dvojrozměrné SDS-PAGE elektroforézy. Následovala identifikace proteinových štěpů metodami MALDI-MS nebo ESI-MS/MS a porovnání takto získaných spekter s údaji v databázích. Tímto postupem byly identifikovány proteiny, které se vyskytují buď pouze v buněčné linii EM-G3 či pouze v NME buňkách a které by mohly být potenciálními nádorovými markery. Dále se nám podařilo prokázat, že nová buněčná linie EM-G3 je linií s progenitorovým charakterem, což znamená, že reprezentuje ranou fázi vývoje tumoru.

Tato práce byla podporována interním grantem MZd NR-8323-3 Prognostické faktory karcinomu prsu a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

VZNIK REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A DUSÍKU PŘI AKTIVACI KREVŇÍCH DESTIČEK

**A. SOBOTKOVÁ^a, J. SUTTNAR^a, K. KNEŘOVÁ^b
a J. E. DYR^a**

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1,
128 20 Praha 2; ^bVysoká škola chemicko-technologická,
Technická 5, 166 28 Praha 6

Krevní destičky se účastní celé řady procesů, které zahrnují interakci destiček s receptory endotelu, „rolování“ destiček po povrchu endotelu, adhezi, agregaci a finální tvorbu trombu. Vzhledem ke složitosti uvedených pochodů je zřejmé, že aktivační kaskáda destiček je velmi jemně regulována. V mnoha studiích se ukazuje, že jedním z regulátorů aktivace destiček mohou být reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Tyto látky jsou endogenního nebo exogenního původu¹.

Jedním z možných mechanismů ovlivnění aktivace destiček je působení reaktivních forem v systému fosfatasa/kinasa ve prospěch kinasové aktivity². Dále je možná přímá modifikace bílkovin účinkem ROS vedoucí k pozměnění jejich struktury a následně i jejich vlastností. Příkladem tohoto faktu je již popsáná nitrací VASpu (vasodilator-sensitive phosphoprotein)³. Cílem této práce bylo izolovat, pokud možno identifikovat oxidačně modifikované bílkoviny, které vznikají při aktivaci krevních destiček různými agonisty.

Z krve zdravých dárců byly izolovány krevní destičky, které jsme v přítomnosti fibrinogenu aktivovali čtyřmi různými agonisty agregace (kolagen, trombin, TRAP, ADP). Sediment aktivovaných i neaktivovaných destiček byl lyzován roztokem dodecylsírany sodného (SDS), karbonyly vzniklé během aktivace byly označeny dinitrofenylhydrazinem. Dinitrofenylhydrazinové produkty karbonylovaných bílkovin i nitrované bílkoviny byly detegovány imunochemicky po jednorozměrné SDS-PAGE.

Pro lepší rozdělení bílkovin jsme dále použili metodu dvojrozměrné elektroforézy (1. směr izoelektrická fokuzace na immobilinových gelech, 2. směr SDS-PAGE) s následnou derivatizací na PVDF membráně. Některé zóny modifikovaných bílkovin byly podrobeny identifikaci hmotnostní spektrometrií na principu MALDI-TOF.

Pomocí imunochemické detekce proti DNP skupinám bylo v sedimentu destiček aktivovaných kolagenem nalezeno několik významných zón redukováných i neredukovaných bílkovin obsahujících karbonyly.

Jednu z významných zón oxidačně modifikovaných bílkovin jsme identifikovali pomocí databáze Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot/). S 95 % pravděpodobností se jedná o cytoskeletární bílkovinu vinkulín. Tato bílkovina spolu s dalšími strukturními látkami spolupracuje na reorganizaci cytoskeletonu během aktivace krevních destiček. Otázkou je, zda modifikace této bílkoviny při aktivaci kolagenem má fyziologický význam.

Tato práce vznikla díky podpoře grantů IGA NA/7616-3, VZ ÚHKT MZ02373601 a GAČR 303/03/0249.

LITERATURA

1. Krotz F., Sohn Y., Pohl U.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1988 (2004).
2. Finkel T.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248 (1998).
3. Sabetkar M., Low S. Y., Naseem K. M., Bruckdorfer K. R.: *Free Radic. Biol. Med.* 33, 728 (2002).

TUBULIN TYROSINE LIGASE EXPRESSION CORRESPONDS TO CHANGES IN THE TYROSINATION/DETYROSINATION STATUS OF α TUBULIN IN PROSTATE CANCER CELLS

**KAREL SOUČEK^{a,b}, ANH D. PHUNG^b, J. CHLOE
BULINSKI^c, RICHARD W. HARPER^b, MICHAEL
MCMANUS^f, and JASON P. EISERICH^{b,c,d}**

^aLab. Cytokinetics, Inst. Biophys., 612 65 Brno, CR. ^bDept Int. Med., ^cDept Physiol. Membr. Biol., and ^dCancer Ctr, School Med., U of California, Davis, CA 95616 USA. ^eDept Biol. Sci. Pathol. & Cell Biol., Columbia U, New York, NY 10027 USA. ^fDiabetes Ctr, U of California, San Francisco USA

Prostate cancer is the second cause of cancer death among men in the Western world. Defining the biomolecular changes associated with prostate cancer is an important endeavor, and potentially will lead to novel strategies for early diagnosis and treatment of prostate cancer. Microtubules play important roles in many aspects of cell function, and are targets for therapy in most forms of cancer, including prostate cancer.

Detyrosination/tyrosination of the C-terminus of α -tubulin is a unique posttranslational modification where the C-terminal tyrosine is cyclically removed by a carboxypeptidase and readded by a tubulin tyrosine ligase (TTL).

It has been shown that detyrosination/tyrosination cycle of α -tubulin is associated with progression through the cell cycle and is involved in cellular differentiation, the precise role of this posttranslational modification in cancer is not known.

Molecular profiling of multiple α -tubulin posttranslational modifications revealed several prostate cancer cell lines displaying decreased expression of tubulin tyrosine ligase protein that was associated with markedly increased elaboration of detyrosinated α -tubulin. Using lentiviral-mediated transfection of a vector expressing TTL siRNA we were able to stably suppress TTL protein expression and induce higher levels of detyrosinated α -tubulin in non-cancerous prostate epithelial cells. These results suggest that the dysregulated tubulin detyrosination/tyrosination cycle is caused by decreased expression of TTL. Our results demonstrate a useful tool for the study of function of this specific posttranslational modification of α -tubulin (detyrosination) that will aid in the elucidation of its role in cancer.

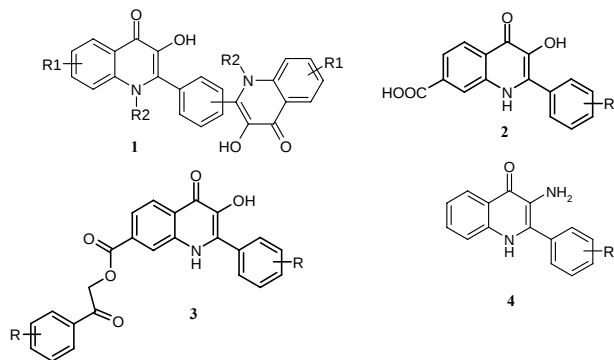
SYNTEZA A CYTOTOXICKÉ ÚČINKY NĚKTERÝCH DERIVÁTŮ 3-HYDROXY-4(1H)-CHINOLONU

MIROSLAV SOURAL^a, JAN HLAVÁČ^a, PAVEL HRADIL^a a MARIÁN HAJDÚCH^b^aKatedra organické chemie PřF Univerzity Palackého, Tř. Svobody 8, 77200 Olomouc; ^bLab. experimentální medicíny FN, Oddělení pediatrie a onkologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Puškinova 6, 775 20 Olomouc
souralm@seznam.cz

V posledních letech se naše pracoviště mimo jiné intenzivně věnuje syntéze a studiu biologické aktivity derivátů 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolonu. Tyto sloučeniny nebyly v minulosti blíže studovány, neboť existovaly pouze ojedinělé metody jejich přípravy. V polovině devadesátých let však byla objevena syntetická cesta vycházející z fenacyl esterů anthranilových kyselin¹, která umožňuje přípravu celé řady těchto derivátů.

Sledované deriváty 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolonu jsou aza-analoga flavonolů – rozsáhlé skupiny přírodních látek s širokým spektrem biologických, mimo jiné i protinádorových účinků. Dosud jediná publikovaná práce zabývající se kancerostatickou aktivitou 3-hydroxy-4(1H)-chinolonů prokázala účinnost chlorovaných derivátů na některých nádorových buněčných liniích².

V současné době je naše pozornost zaměřena mimo jiné na deriváty typu 1 obsahující dva 3-hydroxy-4(1H)-chinolonové skelety v jedné molekule a deriváty typu 2 a 3 substituované karboxylovou skupinou³. V rámci studia analogů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu byla rovněž vypracována syntetická cesta vedoucí k derivátům 3-amino-2-fenyl-4(1H)-chinolonu⁴.



Cytotoxicita připravených derivátů byla testována *in vitro* na pěti nádorových buněčných liniích (A549, K562, K562-Tax, CEM, CEM-DNRB), sledovány byly vztahy mezi strukturou a účinností.

Projekt je podporován grantem MSM6198959216 Ministerstva školství, mládeže a sportu České republiky.

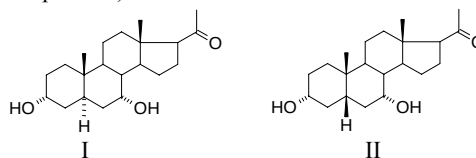
LITERATURA

1. Hradil P., Jirman J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 60, 1357 (1995).

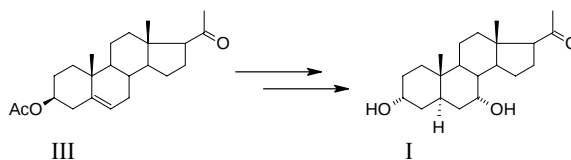
2. Hradil P., Krejčí P., Hlaváč J., Wiedermannová I., Lyčka A., Bertolasi V.: J. Heterocyclic Chem. 41, 375 (2004).
3. Soral M., Hlaváč J., Hradil P., Fryšová I., Hajdúch M., Bertolasi V., Maloň M.: Eur. J. Med. Chem. – v tisku
4. Hradil P., Grepl M., Hlaváč J., Soral M., Maloň M., Bertolasi V.: J. Org. Chem. – v tisku

3 α ,7 α -DIHYDROXY-5 α -PREGNAN-20-ON A 3 α ,7 α -DIHYDROXY-5 β -PREGNAN-20-ON: SYNTEZA A HYDROFILNÍ DERIVATIZACEEVA ŠTASTNÁ^{a,b} a HANA CHODOUNSKÁ^a^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6; ^bKatedra organické a jaderné chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
stastna@uochb.cas.cz hchod@uochb.cas.cz

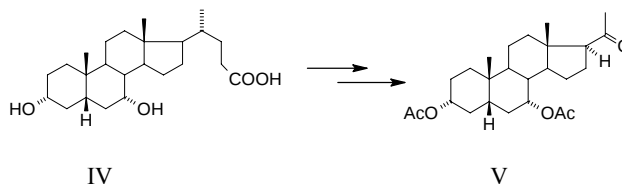
V rámci projektu, který se zabývá aktivitou NMDA receptoru, byly připraveny nové deriváty 3 α ,7 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-onu I a 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-onu II s předpokládanou biologickou aktivitou. Tato účinnost je podmíněna polární substitucí v poloze C3 (např. sulfátovou skupinou^{1,2}).



3 α ,7 α -Dihydroxy-5 α -pregnan-20-on I byl získán vícestupňovou syntézou dle literatury³ z komerčně dostupného pregnenolonu acetátu (III).



Kyselina chenodeoxycholová IV byla transformována postupem uvedeným v literatuře⁴ na 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-on diacetát (V), který byl hydrolyzován na derivát II.



Deriváty I a II byly následně substituovány hydrofilními skupinami (např. sulfátovou, hemisukcinátovou a nikotinoylátovou) v poloze 3 a 7.

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

LITERATURA

1. Irwin R.P., Lin S., Rogawski M.A., Purdy R.H., Paul S.M.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 271, 677 (1994).
2. Horák M., Vlček K., Petrovič M., Chodounská H., Vyklický L. Jr.: J. Neurosci. 24, 10318 (2004).
3. Chodounská H., Kasal A.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 1543 (1998).
4. Dias J.R., Nassim B.: Steroids 35, 405 (1980).

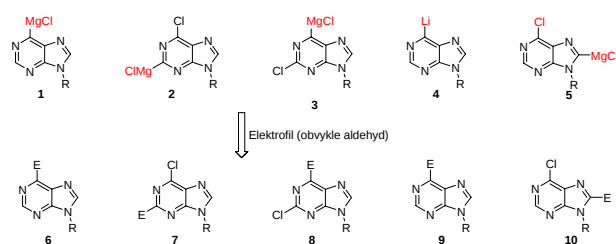
STECHEMETRICKÉ METALOVANÉ PURINY A JEJICH VYUŽITÍ V SYNTÉZE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

TOMÁŠ TOBRMAN a DALIMIL DVOŘÁK

Ústav organické chemie VŠCHT, Technická 5, Praha 6
tobrmant@vscht.cz

Purinové deriváty substituované v polohách 6 a 2 vykazují široké spektrum biologických aktivit. Například 6-aryl a 6-alkynylpuriny jsou známy jako cytostaticky aktivní látky¹, u 6-methylpurinu byla pozorována silná cytotoxicita². Roscovitin a další 2,6,9-trisubstituované puriny jsou inhibitory cyklin-dependentních kinas³. Tyto vlastnosti vedou k syntéze nových derivátů purinu, které obsahují v poloze 2 a/nebo 6 různé funkční skupiny. V současné době jsou k tomuto účelu s výhodou používány postupy založené na stechiometrických nebo katalytických reakcích metalovaných purinů⁴.

Cílem naší práce je příprava a studium stechiometrických reakcí purinů metalovaných v poloze 2, 6 nebo 8 s různými elektrofilmi. Příprava metalovaných purinů^{1–5} je založena na výměně halogen/kov reakcí odpovídajících jodpurinů s isopropylmagnesium chloridem nebo butyllithiem za různých podmínek. V závislosti na použitém činidle a reakčních podmínkách lze izolovat různé produkty. V případě purin-6-ylmagnesium chloridu **1** získáme reakcí s aldehydy sekundární alkoholy **6**, tedy látky které mohou působit jako inhibitory adenosin deaminázy. Magnesiumované puriny **2** a **3** lze modifikovat v poloze 6 nebo 2 reakcí s elektrofilmi za vzniku 2,6-disubstituovaných derivátů **7** a **8**. Přítomnost atomu chloru u takto vzniklých produktech lze využít k další derivatizaci. Přitom vznikají 2,6,9-trisubstituované puriny strukturně podobné Olomoucínu a Roscovitinu.



Zajímavých výsledků bylo dosaženo při pokusu o stabilizaci lithia v poloze 6 purinového jádra. Podařilo se nám připravit purin-6-ylithium **4** (R = Li), které je termicky stabilnější než 6-lithiované 9-alkylpuriny **4** (R = alkyl), u kterých byla popsána migrace lithia do polohy 8 (cit.⁵). Reaktivita takto připraveného purinylithia **4** a dalších metalovaných purinů (např. **5**) bude rovněž diskutována.

Práce byly financovány Grantovou agenturou České republiky (Grant 4islo: 203/03/0035)

LITERATURA

1. Hocek M., Votruba I., Dvořáková H.: Tetrahedron 59, 607 (2003) a reference tam uvedené.
2. Montgomery J. A., Hewson K. J.: J. Med. Chem. 11, 48 (1968).
3. Meijer L., Raymond E.: Acc. Chem. Res. 36, 417 (2003).
4. Hocek M.: Eur. J. Org. Chem. 2003, 245.
5. Leonard N. J., Bryant J. D.: J. Org. Chem. 44, 4612 (1979).

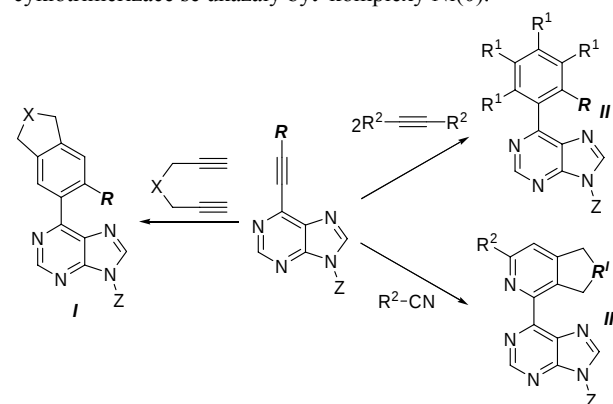
PŘÍPRAVA 6-ARYL- A 6-HETEROARYLPURINŮ [2+2+2]-CYKLOTRIMERIZACEMI

PAVEL TUREK^{a,b}, MARTIN KOTORA^{a,b} a MICHAL HOCEK^b

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
turpav@uochb.cas.cz; kotora@natur.cuni.cz

6-Arylpurinové báze a nukleosidy vykazují zajímavé biologické vlastnosti (cytostatická, antibakteriální a anti-mykobakteriální aktivita).

Jedna z možných metod výstavby benzenového kruhu na purinech spočívá ve využití [2+2+2]-cyklotrimerizačních reakcí alkynylpurinů s alkyny či diiny zprostředkovaných sloučeninami přechodných kovů. V první fázi jsme se zaměřili na přípravu 6-arylpurinů **I** kocyklotrimerizací 6-alkynylpurinů s α,ω -diiny. Jako nejaktivnější katalyzátory cyklotrimerizace se ukázaly být¹ komplexy Ni(0).



Pro přípravu 6-pentasubstituovaných arylpurinů **II** byla použita metoda založená na reakci zirkonacyklopentadienů s 6-alkynylpuriny² v přítomnosti stechiometrického množství komplexu $\text{NiBr}_2(\text{PPh}_3)_2$. Dalším cílem bylo vypracovat metodu pro přípravu 6-heteroaryluridinů **III**. V tomto ohledu byl studován přístup založený na kocyklotrimerizaci 6-dinylpurinů s různými alkyl-, aryl- a heteroarylnitridy za katalýzy $\text{CpCo}(\text{CO})_2$. Tato reakce byla studována za různých reakčních podmínek (způsob iniciace katalyzátoru, teplota, vliv rozpouštědla). Vybrané připravené 6-aryl- a 6-heteroaryluridy byly testovány na cytostatickou aktivitu.

Tento projekt byl proveden za podpory grantu GA ČR (203/03/0035) a Centra pro nová antivirostatika a antineoplastika MŠMT (1M6138896301).

LITERATURA

1. Turek P., Kotora M., Hocek M., Císařová I.: *Tetrahedron Lett.* 44, 785 (2003). Turek P., Kotora M., Tišlerová I., Hocek M., Votruba I., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 69, 9224 (2004).
2. Turek P., Kotora M., Hocek M., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70, 339 (2005).

STUDIUM BAKTERIÁLNÍCH SYMBIONTŮ PŘI BIODEGRADACI POLYVINYLALKOHOLU

T. VÁCLAVKOVÁ, A. VLČKOVÁ, J. RŮŽIČKA, M. KOUTNÝ a M. COUFALÍKOVÁ

*Ústav technologie životního prostředí a chemie, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. TGM 275, 762 72 Zlín
vaclavkova@ft.utb.cz*

Polyvinylalkohol (PVA) patří mezi široce užívané syntetické polymery, který je za určitých okolností biodegradabilní. Jak ukázaly dřívější práce některých autorů, při biodegradaci polyvinylalkoholu se velmi často uplatňují bakteriální symbiotické vztahy, v nichž jedna kultura produkuje enzymy potřebné pro rozklad PVA a druhá poskytuje určité růstové faktory pro onu kulturu první¹.

V této práci byla studována degradace PVA kulturou OT3 v symbiotickém vztahu s *Rhodococcus erythropolis*. Směsná kultura obou bakterií byla schopná rozložit PVA ze vstupní koncentrace 500 mg/l během 42 dnů cca z 80 %. Některé výsledky ukázaly, že charakter jejich symbiotického vztahu je odlišný od jiných, již popsaných, a proto byla uspořádána série pokusů degradací PVA pro objasnění faktoru symbiosy těchto kultur. Koncentrace PVA v pokusech byla měřena spektrofotometricky použitím Finleyho metody, založené na barevné reakci PVA s jódem v přítomnosti kyseliny borité. Výsledky ukázaly, že kultura OT3 je schopna degradace i v přítomnosti mrtvé biomasy *Rhodococcus erythropolis* (78,1 % degradace), z čehož bylo možné usuzovat, že *R. erythropolis* jí nedodává enzym, ale určitý růstový faktor. Protože k obdobným výsledkům vedl i přidavek inaktivní katalasy ke kultuře OT3 (70 % degradace), bylo možné usoudit, že oním faktorem symbiosy je některá aminokyselina nebo hem.

LITERATURA

1. Chiellini E., Corti A., Salvatore D., Solaro R.: *Prog. Polym. Sci.* 28, 963 (2003).

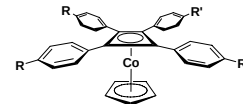
VYUŽITÍ KOBALTOVÝCH KOMPLEXŮ CYKLOBUTADIENU V MOLEKULOVÉ ELEKTRONICE

MICHAL VALÁŠEK^a a JOSEF MICHL^b

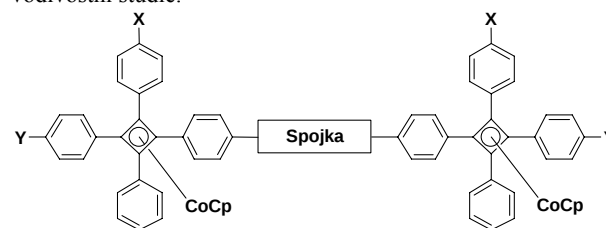
^aKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha

^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO80309-0215, U.S.A.
michalvalasek@hotmail.com

Dikarbonyl(η^5 -cyklopentadienyl)kobalt $[\text{CpCo}(\text{CO})_2]$ má velmi široké uplatnění v chemii organokovů v posledních 50-ti letech¹. Jednou z jeho reakcí je tvorba cyklobutadienových komplexů Rauschovou dimerizací tolanových derivátů². Tyto cyklobutadienové komplexy, díky své čtvercové symetrii, nacházejí široká uplatnění například v molekulové elektronice³ nebo materiálové chemii⁴.



Bude představena metoda ke konstrukci kobaltových komplexů substituovaných tetrafenylcyklobutadienů. Takto připravené sendvičové komplexy, mající vhodné funkční skupiny v *para* polohách na fenylu, byly navzájem propojeny pomocí Suzukioho kaplingu⁵. Propojení je buď přímé nebo přes „aktivní místa“ (1,10-fenanthrolin, 2,2'-bipyridyl), čímž vznikají „molekulové nanosenzory“. Poslední typ propojení je přes „molekulové izolátory“ (bicyklo[1.1.1]pentany, 10-ti a 12-ti vrcholové *p*-karborany, bicyklo[2.2.2]oktan) pro vodivostní studie.



Y - H, SMe, S-*tert*-Bu, COOH,...

X - TMS, I, ...

Spojka - Ph, bifenyl, „molekulové izolátory“, 1,10-Fenanthrolin, ...

Také bude prezentována příprava samoskladného kobaltového komplexu zakončeného karboxylovými kyselinami, který má substituovaný cyklopentadienový kruh vykazující afinitu k povrchu rtuti. Dále bylo využito těchto elektrondonorních komplexů při konstrukci série „molekulových diod“.

Tento projekt byl financován z grantů GA UK 417/2004 a GA ČR 203/04/0921.

LITERATURA

1. Efraty. A.: Chem. Rev. 77, 691 (1977).
2. Rausch M. D., Genetti R. A.: J. Am. Chem. Soc. 89, 5502 (1967).
3. Zheng X., Mulcahy M. E., Horinek D., Galeotti F., Magnera T. F., Michl J.: J. Am. Chem. Soc. 126, 4540 (2004).
4. Bunz U. H. F.: Synlett 10, 1117 (1997).
5. Miyaoura N., Suzuki A.: Chem. Rev. 95, 2457 (1995).

STRUCTURAL STUDIES OF LIGAND BINDING OF NATURAL KILLER CELL RECEPTOR, PROTEIN CD69

**ONDŘEJ VANEK^a, PETR NOVAK^b, VLADIMÍR KOPECKÝ^c, VLADIMÍR KREN^b, JIRÍ BRYNDA^d
a KAREL BEZOUSKA^{a,b}**

^aDept Biochem., Fac. Sci., Charles University, Hlavova 8, 128 40 Prague 2; ^bInst. Microbiol., AS CR, Videnska 1083, 142 20 Prague 4; ^cInst. Phys., Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2; ^dInst. Mol. Genetics, AS CR, Flemingovo 2, 166 36 Prague 6

CD69 protein¹, an early activation antigen of human lymphocytes, is one of the most studied surface receptor molecules involved in tumour recognition by natural killer cells. Although there is certain knowledge about its function from immunological point of view, detailed structural description of target recognition by natural killer cells is missing, including identification of CD69 natural ligand. CD69 receptor belongs to a group of C-type lectin-like lymphocyte receptors and till now several types of possible ligands have been identified or proposed: calcium cation, various carbohydrate structures and even peptides. Crystal structures of carbohydrate recognition domain (CRD) of CD69 molecule have been already published^{2,3}, but crystallization conditions used does not favour ligand binding. In this work we present our structural approach to describe CD69 binding properties together with list of novel therapeutically interesting ligands identified by inhibition tests or equilibrium dialysis. After recombinant production and optimalization of in-vitro refolding of soluble CRD domain of CD69 protein, we analyzed its homogeneity by FT-ICR mass spectrometry and its secondary structure was determined by drop coating deposition Raman spectroscopy method⁴. Further, ligand binding was examined both by Raman spectroscopy and by protein crystallization. We tested several types of proposed CD69 ligands, from single monosaccharide ligand *N*-acetyl-D-glucosamine, to more complex structures, such as antennary oligosaccharides isolated from hen egg white protein ovomucoid, synthetic peptidomimetic ligands based on calixarene core, or heptapeptide ligand from mycobacterial heat shock protein hsp60, which all binds with high affinity to CRD domain of CD69 receptor. Although we found crystallization conditions at neutral pH necessary for ligand binding and we achieved high resolution crystal structures (the best at 1.8 Å), none of the ligand molecules were found in, except for calcium

cations, which were proven by anomalous scattering on synchrotron.

This work was supported by Ministry of Education of the Czech Republic No. MSM 0021620808, by Institutional Research Concept No. AVOZ 50200510, by Grant Agency of the Czech Republic No. 301/05/P567, and by Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic No. A5020403.

REFERENCES

1. Pavlicek J., Sopko B., Ettrich R., Kopecky V., Baumruk V., Man P., Havlicek V., Vrbacky M., Martinkova L., Kren V., Pospisil M., Bezouska K.: Biochemistry 42, 9295 (2003).
2. Natarajan K., Sawicki M. W., Margulies D. H., Mariuzza R. A.: Biochemistry 39, 14779 (2000).
3. Llera A. S., Viedma F., Sanchez-Madrid F., Tormo J.: J. Biol. Chem. 276, 7312 (2000).
4. Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson V. J., Ben-Amotz D.: Anal. Chem. 75, 5703 (2003).

ANTIMIKROBNÍ PROSTŘEDEK PRO OŠETŘOVÁNÍ OBUVI

PAVLÍNA VLTAVSKÁ, JAN RŮŽIČKA, RAHULA JANIŠ a PETR HLAVÁČEK

*Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
Nám. T.G.M. 275, 762 72 Zlín
vltavska@ft.utb.cz*

Vzhledem ke stále se zvyšujícímu procentu populace trpícímu mykotickými onemocněními je třeba vyvíjet a testovat nové protimikrobní látky. Mezinárodní statistiky uvádějí, že u každé třetí osoby se na nohou vyskytují mykomy¹ a je tedy nezbytné zaměřit se kromě léčby i na prevenci těchto stavů. Velkou roli může zejména u diabetiků sehrát nošení obuvi vybavené podšívkovými a stélkovými materiály s úpravami inhibujícími růst patogenních mikroorganismů (plísní, kvasinek i bakterií) a případně i omezujícími rozvoj saprofytických druhů.

V současné době chybí na našem trhu vhodné přípravky s žádoucími protimikrobními vlastnostmi a proto se náplní práce stalo ověření účinnosti přípravku na bázi monoacylglycerolu kyseliny kaprylové, u něhož již byla prokázána významná protimikrobní účinnost². Úprava podšívkových a stélkových materiálů uvedeným (navrženým) prostředkem byla testována agarovými testy, v nichž byla odolnost upravených vzorků sledována po jejich kontaminaci patogenní plísní *T. mentagrophytes*, patogenní kvasinkou *C. albicans*, saprofytickou plísní *A. niger* a bakteriemi *E. coli*, *K. pneumoniae* a *S. aureus*. Výsledky ukázaly, že úprava materiálů sice neinhibovala růst saprofytické plísně *A. niger*, avšak zcela zabránila rozvoji všech testovaných patogenních druhů mikroorganismů.

LITERATURA

1. Pierard G.: Dermatology 202, 220 (2001).

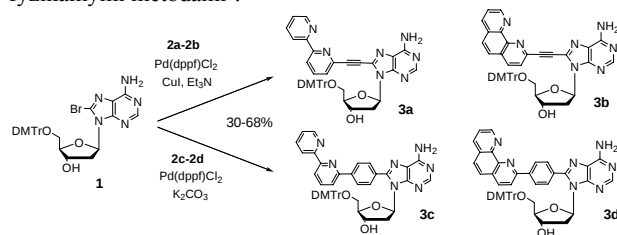
2. Motýl J.: *Testování antimykotických účinků monoacylglycerolů aplikovaných na podšivkové materiály*, Diplomová práce, FT UTB, Zlín, 2003.

SYNTEZA MODIFIKOVANÝCH NUKLEOZIDOV A OLIGONUKLEOTIDOV NESÚCÍCH BIPYRIDÍNOVÉ ALEBO FENANTROLÍNOVÉ LIGANDY

MILAN VRÁBEL a **MICHAL HOCEK**

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

Oligonukleotidy obsahující ve svojej štruktúre elektrochemický marker sú často používaným nástrojom v chemickej biológii alebo biofyzike (napr. pre štúdium: hybridizácie DNA, interakcií protein-nukleových kyselín, prenosu náboja)¹. Nukleobáza, značená elektrochemickým markerom, môže po zabudovaní do štruktúry DNA reflektovať elektrochemické zmeny detekovateľné fyzikálnymi metódami².



Vzhľadom na uvedené skutočnosti sme sa rozhodli pre syntézu modifikovaných nukleozidov nesúcich bipyridínové alebo fenantrolínové ligandy, ktoré môžu po komplexácii s prechodnými kovmi slúžiť ako elektrochemické markery.

Sonogashira cross-coupling reakciou etynylbipyridínu (**2a**) alebo etynylfenantrolínu (**2b**) s chráneným 8-bromodeoxyadenozínom (**1**) za katalýzy paládiumu sme pripravili konjugáty (**3a**) a (**3b**) v dobrých výťažkoch. Suzuki cross-coupling reakcia pinakol esterov zodpovedajúcich boronových kyselín bipyridínu (**2c**) a fenantrolínu (**2d**) poskytla príslušné fenylénom premostené deriváty (**3c**) a (**3d**).

Etynylbipyridínový derivát (**3a**) bol po benzoylácii amino skupiny adenínu prevedený na *N,N*-diisopropylfosforamidát a následne zabudovaný pomocou štandardnej automatickej oligonukleotidovej syntézy do štruktúry oligonukleotidu vo výťažku 30 %.

Vzhľadom na uvedené výsledky sme sa v ďalšom kroku rozhodli pre prípravu modelových zlúčenín pre komplexačné reakcie s prechodnými kovmi. Výsledky tejto časti práce budú v prezentácii taktiež diskutované.

Táto práca je súčasťou EC Specific Targeted Research Project Control of Assembly and Charge Transport Dynamics of Immobilized DNA (CIDNA) a bola podporovaná Grantovou Agentúrou ČR (grant č. 203/03/0035). Autori ďakujú Dr. Pohlovi za meranie NMR spektier a Dr. Rosenbergovi za syntézu oligonukleotidu.

LITERATURA

- (a) Rist M., Amann N., Wagenknecht H. -A.: Eur. J. Org. Chem. 2003, 2498. (b) Amann N., Pandurski E., Fiebig T., Wagenknecht H. -A.: Chem. Eur. J. 2002, 4877. (c) Graham D., Parkinson J. A., Brown T. :J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 1998, 1131. (d) Catalanotti B., Galeone A., Mayol L.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 2005. Reham A. I., Elkhair A., Netzel T.: Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 2005, 85.
- Wagenknecht H. -A.: Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 115, 2558; Angew. Chem., Int. Ed. 2003, 2454.

TRANSFORMACE CHLORBENZOOVÝCH KYSELIN ROSTLINNÝMI TKÁŇOVÝMI KULTURAMI

BLANKA VRCHOTOVÁ^a, **M. MACKOVÁ^a**,
T. MACEK^b a **K. FRANČOVÁ^a**

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

V prírode se chlorbenzoové kyseliny mohou vyskytovat v důsledku použití herbicidů v zemědělství, jsou meziproduktem při výrobě některých barviv a léků a v neposlední řadě vznikají jako produkty horní bakteriální dráhy odbourávání polychlorovaných bifenylů. Jejich další osud a možnost odstranění z životního prostředí závisí na jejich koncentraci, struktuře a také na organismech vyskytujících se v daném ekosystému.

Bakteriální metabolismus chlorbenzoových kyselin je již poměrně dobře prostudován na rozdíl od rostlinného. Cílem mé práce je zjistit, zda jsou rostliny schopné transformovat chlorbenzoové kyseliny, určit produkty, které při tomto procesu vznikají a změřit toxicitu jednotlivých chlorbenzoových kyselin pro buňky vyšších rostlin.

Jako model byly vybrány rostlinné tkáňové kultury tří rostlinných druhů pěstované *in vitro*. Embryogenní morfologicky diferencovaná kultura křenu selského (*Armoracia rusticana* K 54), kalusová kultura tabáku viržinského (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38) a diferencovaná kultura typu "hairy root" lilku černého (*Solanum nigrum* SNC 90), u kterých byla primárně prokázána schopnost degradace PCB.

Bylo prokázáno, že rostlinné buňky metabolizují chlorbenzoové kyseliny. Účinnost procesu je závislá podobně jako u mikroorganismů na množství a poloze chlorů v molekule chlorbenzoové kyseliny a použitém rostlinném druhu. Nejvyšší schopnost transformace (téměř 100 %) prokázaly buňky rostlinné tkáňové kultury lilku černého s 2-, 3-, 4-chlorbenzoovou kyselinou, 2,3-di-, 2,4-di-, 2,5-dichlorbenzoovou kyselinou a 2,3,5-trichlorbenzoovou kyselinou.

Analýza produktů transformace 2,4-dichlorbenzoové kyseliny buňkami kultury lilku černého prokázala vznik methylesteru 2,4-dichlorbenzoové kyseliny. Obdobně byl methylester nalezen i po transformaci 2,3-dichlorbenzoové kyseliny.

Měření toxicity jednotlivých chlorbenzoových kyselin na modelu diferencované kultury typu "hairy root" lilku černého prokázalo různou toxicitu pro buňky vyšších rostlin. Nejvyšší toxicita pro rostlinné buňky byla naměřena u chlorbenzoových kyselin s dvěma chlory a nejnižší s třemi chlory v molekule chlorbenzoové kyseliny.

Tato práce byla podporována granty GA ČR 203/06/0563 a MSM 6046137305

DIFFERENTIAL EFFECTS OF SELECTED NATURAL COMPOUNDS WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY ON THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR AND NF- κ B IN HeLa CELLS

RADIM VRZAL and ZDENĚK DVOŘÁK

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

In this work we investigated the effects of natural compounds with anti-inflammatory activity (berberine, sanguinarine, chelerythrine and colchicine) on two important anti-inflammatory and pro-inflammatory players, i.e. glucocorticoid receptor (GR) and nuclear factor kappa B (NF- κ B), respectively¹.

Colchicine and berberine had no effect on the nuclear translocation of the p65 subunit of NF- κ B and these compounds did not affect nuclear translocation of the GR as well. Colchicine caused rapid degradation of the GR protein. Sanguinarine and chelerythrine elicited the nuclear translocation of both p65 and GR. None of the tested compounds triggered GR and/or NF- κ B transcriptional activities, as monitored by reporter assays using HeLa cells transiently transfected with glucocorticoid response element (pGRE-LUC) and/or NF- κ B elements fused to luciferase gene (pNF- κ B-luc), respectively. The binding of 3H-labelled glucocorticoid to GR was significantly decreased by sanguinarine and chelerythrine.

In conclusion, structurally diverse natural antiflogistics displayed differential effects on GR and NF- κ B, the factors being often targets in the inflammatory combat.

This research was supported by grant MSM 6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by grant GACR 303/04/P074 from the Grant Agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Dvořák Z., Vrzal R., Maurel P., Ulrichová J.: Chem. Biol. Interact. 159, 117 (2006).

FUNCTION OF THE ANTI-APOPTOTIC Bcl-2 PROTEIN IS CHANGED BY POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION

EVA ZAHRADNÍČKOVÁ^a, JANA VAŇKOVÁ^b, VENDULA MACEČKOVÁ^a a JAN ŠMÁRDA^a

^aÚstav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bLaboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno
zahradka@sci.muni.cz

Linie monoblastů transformovaných onkogenem v-myb viru ptačí myeloblastózy (BM2) je vhodným modelem pro studium AML. V naší laboratoři ji využíváme pro analýzu molekulárních mechanismů proliferace, diferenciace a apoptózy. Jedním z proteinů ovlivňujících průběh programované buněčné smrti je anti-apoptotický protein Bcl-2, který je v buňce lokalizován v membránách mitochondrií, ER nebo jádra. Předpokládá se, že jeho účinek je převážně důsledkem interakce s pro-apoptotickými proteiny, které jsou touto vazbou inaktivovány. Pro podrobnější studium funkce proteinu Bcl-2 jsme vytvořili derivát linie BM2 exprimující gen bcl-2. Neočekávaně jsme prokázali, že buňky BM2 se zvýšenou hladinou proteinu Bcl-2 (BM2Bcl2) vykazovaly již po 24 hodinách výrazně sníženou viabilitu, kondenzaci chromatinu, fragmentaci jader a internukleozomové štěpení DNA. Westernovým přenosem jsme v buňkách BM2Bcl2 prokázali výskyt neobvyklých forem proteinu Bcl-2 o vyšší molekulové hmotnosti, jejichž přítomnost je zřejmě důsledkem posttranslačních modifikací. Výskyt těžších forem není specifický pouze pro linii BM2Bcl2, detekovali jsme je i ve fibroblastech QT6 a buňkách osteosarkomu Saos-2 po transfekci cDNA kódující Bcl-2. Fosfospecifickou protilátkou jsme prokázali, že se jedná o modifikaci fosforylací. Z imunoprecipitačních experimentů vyplývá, že hyperfosforylovaný protein Bcl-2 není schopen interakce se svými cílovými proteiny (např. Beclin-1) a proto zřejmě není schopen plnit svou anti-apoptotickou funkci.

Tato práce byla podporována granty 301/06/0036 Grantové agentury České republiky a MSM0021622415 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky.



SIGMA-ALDRICH



SIGMA-ALDRICH

SEZNAM AUTORŮ

Adam, Jan	373	Haškovec, Cedrik	398
Adam, Vojtěch	373, 384, 399, 400	Havel, Ladislav	399, 400
Alexandrová, Zuzana	403	Herrmann, Pavel	382
Altrock, Wilko D.	380	Hlavackova, Veronika	382
Ananchenko, Gennady A.	401	Hlaváč, Jan	407
Anzenbacher Jr., Pavel	401	Hlaváček, Petr	410
Arlt, Volker M.	378	Hocek, Michal	393, 405, 408, 411
Babčanová, Soňa	396	Hofmanová, Jiřina	383, 394
Bačáková, Lucie	402	Horák, Petr	377, 388
Baloun, Jiří	399	Horváth, Viktor	383, 394
Benková-Frimlová, Eva	389	Houska, Milan	374
Bezouska, Karel	410	Hovorka, Oldřich	392
Blahos, Jaroslav	382	Hradecký, Jan	384
Blašík, Ondřej	373	Hradil, Pavel	407
Bobek, Jan	399	Hrdina, Radim	384
Bohatá, Karolína	374	Hroudová, Miluše	385
Bóka, Károly	390	Hrstka, Roman	385
Brdička, R.	391	Hulová, Dagmar	381
Brožová, Markéta	405	Chaloupková, Radka	385
Bruchová, H.	391	Chlupáč, Jaroslav	402
Brychtová, Y.	374	Chodounská, Hana	388, 407
Brynda, Eduard	374, 402	Chumchalová, J.	374
Brynda, J.	394	Imberty, Anne	373
Brynda, Jiri	410	Imramovský, A.	386
Bryndová, J.	392	Jágr, Michal	387
Brzobohatý, Břetislav	389	Janiš, Rahula	410
Bukovská, Soňa	374	Jiráček, Jiří	376, 405
Bulinski, J. Chloe	406	Jiroš, Pavel	392
Burketová, Lenka	390	Jonáková, V.	376
Cankař, Petr	374	Jurček, Ondřej	387
Castaño, Obis	378	Kapras, Vojtěch	388
Cibulková, M.	376	Kašný, Martin	388
Ciencialová, Alice	376	Kessels, Michael	380
Císařová, Ivana	393	Kindl, Jiří	392
Coleman, Anthony W.	401	Kiran, Nagavalli S.	389
Coufalíková, M.	409	Kizek, René	373, 384, 399, 400
Ctibor, Karel	387	Klamová, Hana	398
Cvačka, Josef	378, 392	Kleibl, Zdeněk	404
Čáp, Michal	375	Klusoňová, P.	392
Čermák, J.	391	Kneřová, K.	406
Červený, Lukáš	375	Koblížek, Michal	389
Damborský, Jiří	384, 385	Koča, Jaroslav	373
Dobrev, Petr	397	Kohout, Michal	390
Dolečková, Kateřina	377, 388	Kopecky, Vladimír	410
Doležilová, Ivana	377	Korbelová, Barbora	390
Doubek, M.	374	Kosinová, Eva	395
Dračínská, Helena	378	Kotora, Martin	382, 384, 408
Dračínský, Martin	379	Koutek, Bohumír	376
Dvořák, Dalimil	408	Koutný, M.	409
Dvořák, Zdeněk	379, 412	Kovářová, Anna	391
Dvořáková, Marcela	380	Kozmík, Václav	390, 391
Dyr, Jan Evangelista	402	Kozubík, Alois	383, 394
Dyr, J. E.	406	Kožíšek, M.	394
Eckschlager, Tomáš	402	Kráčmarová, A.	391
Eiserich, Jason P.	406	Krafková, Edita	392
Fábrý, M.	394	Král, V.	394
Fejtova, Anna	380	Kramer, Karl J.	400
Felsberg, Jürgen	399	Krejčík, Zdeněk	385
Ferret-Bernard, Stephanie	388	Kren, Vladimír	410
Filová, Elena	402	Kročová, Zuzana	385
Fischer, Peter M.	374	Kryštof, Vladimír	374
Fodor, József	390	Křivánková, Kateřina	396
Francová, H.	374	Kříž, Zdeněk	373
Frančová, K.	411	Kučka, M.	392
Frei, Eva	402	Kuglík, P.	374
Fryšová, Iveta	374	Kuhrová, V.	374
Gerber, Stefan H.	380	Kuchař, Martin	393
Glogarová, Milada	390, 391	Lamač, Martin	393
Grochová, Diana	381	Lincová, Eva	394
Grycová, Lenka	381	Linhartová, Irena	403
Gundelfinger, Eckart D.	380	Linková, V.	374
Haisel, Daniel	397	Macečková, Vendula	412
Hajdúch, Marián	407	Macek, Tomáš	377
Harper, Richard W.	406	Macek, T.	411
Hartvich, Petr	382	Macková, Martina	377

Macková, M.	411	Soural, Miroslav	407
Mader, P.	394	Sova, Petr	383
Malbeck, Jiří	389, 397	Standara, Stanislav	381
Malčíková, J.	374	Stará, Irena G.	397, 403
Maňásková, P.	376	Starý, Ivo	397, 403
Marčecová, Zuzana	395	Stibor, Ivan	401
Marek, Radek	381	Stiborová, Marie	378, 398, 402
Marková, Michaela	395	Straková, Monika	385
Mašín, Michal	389	Stránský, Vladimír	387
Matoušková, Eva	405	Streinz, Ludvík	382
Mayer, J.	374	Strnad, Miroslav	374
Mazancová, K.	392	Strnad, Hynek	385
Mcmanus, Michael	406	Stulík, Jiří	385
Mentzlová, D.	374	Südhof, Thomas C.	380
Michalová, Eva	396	Suttner, J.	406
Michl, Josef	409	Svitáková, X.	374
Mikelová, Radka	384	Svitáková, Miluška	381
Mikeš, Libor	377, 388	Svoboda, Michal	373
Mikšák, I.	392	Svoboda, Jiří	390, 391
Mikulík, Karel	399	Šaman, David	397, 403
Milotová, M.	396	Šanda, Miloslav	376
Míšek, Jiří	397	Šebo, Peter	395, 403
Modrianský, Martin	379	Šigutová, Daniela	399
Monreal, F. J.	386	Šilhár, Peter	405
Moravcová, Jitka	387	Šindelka, Radek	376
Moravcová, Jana	398	Šmarda, Jan	412
Motyka, Václav	397	Šmardová, J.	374
Mountford, Adrian	377	Šmardová, Jana	381
Mozga, Tomáš	385	Šťastná, Eva	407
Mráz, Jaroslav	387	Štaud, František	375
Mýtinová, Zuzana	397	Štěpánek, Luděk	375
Neubaerová, Tereza	377	Štěpnička, Petr	393
Neubauerová, Tereza	376	Štěrbá, Jaroslav	396
Novák, Petr	410	Štouračová, R.	394
Novotná, Vladimíra	390, 391	Švecová, Lucka	375
Osička, Radim	403	Švihálková-Šindlerová, Lenka	383
Otáhalová, Eva	398	Teplý, Filip	397
Páca, Jan	398	Tichá, M.	376
Pačes, Václav	385	Tobman, Tomáš	408
Pácha, J.	392	Tom Dieck, Susanne	380
Palečková, Petra	399	Trbušek, M.	374
Palková, Zdena	375	Trnková, Libuše	384
Pávek, Petr	375	Turek, Pavel	408
Petřlová, Jitka	373, 399, 400	Ubík, Karel	405
Petřek, Jiří	399	Udachin, Konstantin A.	401
Phung, Anh D.	406	Václavková, T.	409
Pin, Jean-Philippe	382	Valášek, Michal	409
Pohl, Radek	401	Valentová, Olga	390
Pojarova, Michaela	401	Valík, Dalibor	396
Pokorná, Martina	373	Valterová, Irena	380, 392
Poljaková, Jitka	402	Vanek, Ondrej	410
Pospíšil, Martin	387	Vaněk, Tomáš	380
Prášil, Ondřej	389	Vaňková, Jana	381, 412
Prezeau, Laurent	382	Vinšová, J.	386
Procházková, Kateřina	403	Víteček, Jan	399
Prokop, Martin	373	Vlček, Čestmír	385
Prokop, Zbyněk	384, 385	Vlčková, A.	409
Pšikal, Ivan	395	Vltavská, Pavlína	410
Qualmann, Britta	380	Vojtěšek, Bořivoj	385, 396
Ravčuková, Barbora	381	Vrábel, Milan	411
Reková, Alena	389	Vrchotová, Blanka	411
Riedel, Tomáš	402	Vrzal, Radim	379, 412
Riljak, V.	403	Vyklický, Jr., Ladislav	388
Ripmeester, John A.	401	Wilhelmová, Nad'a	397
Rulišek, L.	394	Wimmer, Zdeněk	387
Růžicka, J.	409	Wimmerová, Michaela	373
Růžicka, Jan	410	Zahradníčková, Eva	412
Řezáčová, P.	394	Závada, J.	394
Sadílková, Lenka	403	Závadová, Z.	394
Sedláček, J.	394		
Sehnal, Petr	403		
Sejbal, Jan	379		
Selicharová, Irena	405		
Scholzová, Eva	404		
Slouka, Jan	374		
Smutná, Kateřina	405		
Sobotková, A.	406		
Souček, Karel	383, 394, 406		

