

XV MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ  
MLADÝCH BIOLOGŮ,  
BIOCHEMIKŮ  
A CHEMIKŮ

12. 5. – 15. 5. 2015

hotel Devět Skal Milovy

sborník redigovali  
Radmila Řápková, Martin Fusek, Pavel Drašar

*Organizátoři konference vyslovují vřelé poděkování za podporu*



*Je to trochu neuvěřitelné, že se letos koná je již patnáctý ročník naší konference. Při prvním ročníku se abstrakta posílala na disketách, pro které již dnešní počítače nemají mechaniku, neexistovaly USB disky, a nemyslím si, že někdo měl mobilní telefon. Přednášky byly krásně namalovány na průhledných blanách a večer nikdo neseděl u počítače, protože žádné spojení přes wifi nebylo a nebyl ani FaceBook, ani gmail chat.*

*Tedy mnohé se změnilo. Ale mnohé zůstalo a to především zaujetí pro vědeckou práci, zájem slyšet, co se dělá na jiných pracovištích, zájem poznat mladé kolegy a vyslechnout si jejich přednášky. Výrazně se zlepšila kvalita prezentací a kvalita diskuze. Během těch roků se konference zúčastnilo k tisícovce mladých vědkyň a vědců. Někteří se účastnili jednou, jiní několikrát. Zajímavé je si projít seznamy finalistů. Řada z nich je nyní vedoucími vlastních vědeckých skupin či jsou úspěšní v jiných oblastech.*

*Letos jsme zařadili novou kategorii – mimo biologie/biochemie a organické chemie máme nově také kategorii biomateriálů a to patří také ke změnám, které, jak doufám, budou kvalitu konference stále zvyšovat.*

*Patnácté výročí je určitě oslavení hodné. A při oslavách se také děkuje. Já chci poděkovat neměnné přízni nadšených a stále mladých spoluorganizátorů Ireně Krumlové a Pavlovi Drašarovi. Byli v tom se mnou od začátku a já jim za jejich pomoc velmi děkuji. Samozřejmě chci moc poděkovat i ostatním porotcům – Jitce Moravcové, Jitce Ulrichové, Šárce Pospíšilové, Jaroslavu Blahošovi, Jiřímu Damborskému, Martinu Kotorovi, Ivo Starému, Filipu Teplému a Jiřímu Moosovi.*

*Konference je otevřena každému a je plně hrazena organizátory. Tedy ne organizátory, ale sponzory. A zde bych chtěl vyjádřit speciální poděkování hlavnímu sponzorovi, společnosti Sigma-Aldrich. Ale takové poděkování je příliš neosobní, a proto musím vyjádřit veliký dík Daniele Dornerové, ředitelce Sigma-Aldrich a Jiřímu Moosovi, vrcholovému manažeru této společnosti. Asi málokdo si uvědomí, že společnost Sigma-Aldrich věnovala během těch let více než tři miliony korun na to, aby mohl přijet každý student či mladý vědecký pracovník nezávisle na tom, jestli jeho vedoucí má na jeho pobyt peníze.*

*Letošnímu ročníku přeji mnoho kvalitní vědy, mnoho dobrých diskuzí ale také zábavu a sportovní zážitky v krásné krajině Vysočiny.*

Martin Fusek

## ÚLOHA mikroRNA MOLEKULY MIR-145 V BUNĚČNÉM PŘEPROGRAMOVÁNÍ

**TOMÁŠ BÁRTA<sup>a</sup>, LUCIE PEŠKOVÁ<sup>b</sup>, LYLE ARMSTRONG<sup>c</sup>, MAJLINDA LAKO<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Mezinárodní centrum klinického výzkumu (ICRC), FN u sv. Anny v Brně, 656 91 Brno; <sup>b</sup> Oddělení histologie a embryologie, LF 625 00 Brno; <sup>c</sup> Institute of Genetic Medicine, Newcastle Univ., ICFL, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, Velká Británie  
tomas.barta@fnusa.cz

Technologie buněčného přeprogramování somatických buněk do indukovaných pluripotentních (iPS) buněk představuje velmi slibnou techniku pro získávání vhodných buněčných typů pro biomedicinský výzkum a buněčnou terapii. Proces přeprogramování zahrnuje rozsáhlé změny na úrovni molekulárních profilů a signálních drah včetně mikroRNA (miRNA) molekul. miRNA jsou krátké nekódující RNA molekuly (dlouhé asi 22 nukleotidů), které hrají důležitou aktivní úlohu na úrovni post-transkripční regulace mRNA v mnoha buněčných procesech včetně buněčného přeprogramování. Avšak mechanismy účinku miRNA molekul v tomto procesu nejsou zcela objasněny.

miRNA expresní profil iPS buněk obsahuje skupiny (clustery) miRNA molekul, které jsou specificky exprimovány, nebo umlčeny jen v iPS buňkách. V této studii jsme se zaměřili na molekulu miR-145, která není v iPS buňkách exprimována, ale je vysoce exprimována v somatických nebo terminálně diferencovaných buňkách. V průběhu přeprogramování somatických buněk do iPS buněk je exprese miR-145 v rané fázi přeprogramování snížena a v iPS buňkách je obtížně detekovatelná. Pro studium funkce miR-145 jsme generovali lidské fibroblastové linie stabilně exprimující inhibitor miR-145. Inhibice miR-145 vedla k indukci buněčné plasticity, která byla doprovázena mesenchymálně-epiteliální tranzicí (MET) a zvýšenou expresí Oct4, Nanog, Klf4 a c-Myc, které jsou nezbytné k indukování a udržování pluripotence. Vzhledem k tomu, že MET je stěžejní součástí rané fáze buněčného přeprogramování a zároveň dochází ke zvýšené expresi pluripotentních genů v buňkách s inhibovanou miR-145, rozhodli jsme se otestovat, zda inhibice miR-145 zvyšuje efektivitu přeprogramování do iPS buněk v přítomnosti faktorů pro přeprogramování. Inhibice miR-145 v lidských fibroblastech významně zvýšila úspěšnost přeprogramování do iPS buněk, což bylo způsobeno právě díky zvýšené expresi pluripotentních genů a indukci MET. Tato studie přispívá k pochopení mechanismů účinku miRNA molekul, které představují důležitou skupinu molekul hrající aktivní roli v přeprogramování buněk.

*Tato studie byla podpořena European Regional Development Fund - Projekt FNUSA-ICRC (No. CZ.1.05/1.1.00/02.0123), projektem ICRC-ERA-HumanBridge (no. 316345), který je financován Evropskou komisí a MUNI/A/1014/2013, který je financován MŠMT.*

## KADMIUM, KOBALT A NIKL INHIBUJÍ SEKVENČNĚ SPECIFICKOU VAZBU PROTEINŮ P63 A P73 IN VITRO A IN VIVO

**PAVLA BAŽANTOVÁ<sup>a,b</sup>, MATEJ ADÁMIK<sup>b</sup>, ALENA POLÁŠKOVÁ<sup>b</sup>, MARIE BRÁZDOVÁ<sup>b</sup>, PETR PEČINKA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Chittussiho 10, 710 00 Slezská Ostrava; <sup>b</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno  
pavla.bazantova@osu.cz

Regulací exprese řady cílových genů se proteiny rodiny p53 významně podílí na řízení mnoha buněčných procesů. Známý jsou především pro jejich význam při prevenci karcinogeneze, proteiny p63 a p73 hrají důležitou úlohu při diferenciaci a vývoji. Pro správnou funkci transkripčních faktorů je rozhodující schopnost se specificky vázat na DNA. Tuto vazbu zajišťuje DNA-vazebná doména (DBD), která je mezi členy rodiny p53 vysoce homologní. Bylo zjištěno, že oxidací cysteinů DBD, podílejících se na koordinaci zinečnatého iontu, dochází ke ztrátě vazebné schopnosti proteinů<sup>1</sup>. Dále bylo zjištěno, že nadbytek zinečnatých iontů sekvenčně specifickou vazbu proteinu p53 inhibuje, podobně jako ionty těžkých kovů<sup>2</sup>. Cílem naší práce bylo zjistit, jaký vliv mají zmíněné ionty na vazebné domény proteinů p63 a p73.

V naší práci jsme použili dvojmocné ionty přechodných kovů – kadmium, kobalt a nikl – ke studiu jejich účinku na sekvenčně specifickou vazbu DBD proteinů p53, p63 a p73 *in vitro* i *in vivo*. Na základě výsledků elektroforetické retardační analýzy jsme došli k závěru, že kadmínaté ionty inhibují sekvenčně specifickou vazbu k p53 konsensní sekvenci při mikromolární koncentraci. U kobaltnatých a nikelnatých iontů byl podobný efekt pozorován až při milimolárních koncentracích. Také transaktivace některých promotorů (BAX, MDM2, p53CON) v buňkách H1299 transfekovaných členy rodiny p53 byla inhibována mikromolární koncentrací kadmínatých iontů, naopak ionty kobaltnatými a nikelnatými nikoli. Dále jsme zjistili, že DBD proteinů jsou po vazbě na DNA responzivní elementy chráněny před inhibičními účinky použitých těžkých kovů. V naší laboratoři bylo již dříve zjištěno, že chelatační činidla EDTA a DTT mohou zvrátit inhibiči sekvenčně specifické vazby p53, která byla způsobena působením přechodných iontů (zinek, kobalt, nikl). Nyní jsme zjistili, že po použití chelatačního činidla EDTA ve dvojnásobném molárním přebytku lze kadmíem inhibovanou vazbu obnovit také u centrálních domén proteinů p63 a p73 (cit.<sup>3</sup>).

*Tato práce vznikla za podpory grantů OPVK CZ.1.07/2.3.00/30.0019 a GAČR číslo 13-36108S.*

### LITERATURA

1. Tichý V., Navrátilová L., Adámik M., Fojta M., Brázdová M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 445 (2013).
2. Paleček E., Brázdová M., Černocká H., Vlk D., Brázda V., Vojtěšek B.: *Oncogene* 18, 3617 (1999).
3. Adámik M., Bažantová P., Navrátilová L., Polášková A., Pečinka P., Holaňová L., Tichý V., Brázdová M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 29 (2015).

## MECHANIZMUS ZOSTAVENIA A STABILIZÁCIE RAD51 PRESYNAPTICKÉHO FILAMENTU PROSTREDNÍCTVOM BRCA2 PROTEÍNU

**ONDREJ BELÁŇ, MÁRIO ŠPÍREK, LUMÍR KREJČÍ**

*Laboratory of Recombination and DNA Repair, National Centre for Biomolecular Research and Department of Biology, Masaryk University, Kamenice 5/A7, 625 00 Brno 424542@mail.muni.cz*

Homologická rekombinácia (HR) je mechanizmus zodpovedný za presnú opravu dvojreťazcových zlomov DNA<sup>1</sup>. Medzi kľúčové proteíny, ktoré sa jej zúčastňujú, patria rekombinasa RAD51 a rekombinačný mediátor BRCA2. Mutácie v BRCA2 géne sú spojené so vznikom rakoviny<sup>2</sup> a Fanconioho anémiou<sup>3</sup>. BRCA2 viaže RAD51 cez BRC motívy (BRC1-8) sprostredkujúce väzbu RAD51 na ssDNA<sup>4</sup> a C-terminálnu doménu, exón 27 (Ex27), kde TR2-peptid predstavuje minimálnu aktívnu časť. Ex27 viaže oligomér RAD51<sup>5</sup> a je potrebný pri blokovaní degradácie zastavených replikačných vidlíc<sup>6</sup>.

Pomocou dvojhybridného systému boli v partnerskom laboratóriu identifikované mutanty RAD51, ktoré majú narušenú schopnosť interagovať s BRC3 alebo Ex27 proteínu BRCA2. Narušenia interakcie RAD51 mutantov s fúznymi proteínmi BRCA2 bolo overované *in vitro*. TR2-peptid chráni RAD51-ssDNA filamente pred destabilizujúcim účinkom BRC3, avšak zvýšenie stability voči disociácii pri nadbytku voľnej ssDNA bolo menej výrazné, čo sme potvrdili metódou stopped-flow, ktorá zároveň odhalila zmenu mechanizmu zostavenia a rozpadu RAD51 filament pri pre-inkubácii RAD51 s TR2-peptidom. RAD51 mutant defektný v interakcii s Ex27 tieto zmeny takmer nevykazoval. *In vivo* experimenty v myších embryonálnych kmeňových bunkách poslúžili na fenotypizáciu mutantov a potvrdzujú naše *in vitro* zistenia.

Získané dáta poukazujú na fyzikálnu zmenu RAD51 filamentu pri viazaní Ex27 BRCA2 proteínu, takýto filament však nie je výraznejšie stabilizovaný voči voľnej ssDNA. Je však chránený pred narušením vlákna BRC motívmi. Ex27 je zrejme potrebný pre podporenie vytvorenia nových nukleačných jadier pri tvorbe RAD51 filamentu alebo ako ochrana pred účinkom anti-rekombinasy. Naše výsledky pomáhajú objasniť mechanizmus HR, jej význam pre stabilitu genómu a súvis s rakovinou.

*Táto práca vznikla za podpory grantov GACR13-26629S a GACR207/12/2323.*

### LITERATÚRA

1. Arnaudeau C., Lundin C., Helleday T.: *J. Mol. Biol.* 307, 1235 (2001).
2. Liede A., Karlan B. Y., Narod S. A.: *J. Clin. Oncol.* 22, 735 (2004).
3. Howlett N. G., Taniguchi T., Olson S., Cox B., Waisfisz Q., De Die-Smulders C., Persky N., Grompe M., Joenje H., Pals G., Ikeda H., Fox E. A., D'Andrea A. D.: *Science* 297, 606 (2002).
4. San Filippo J., Chi P., Sehorn M. G., Etchin J., Krejčí

L., Sung P.: *J. Biol. Chem.* 281, 11649 (2006).

5. Davies O. R., Pellegrini L.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 475 (2007).
6. Schlacher K., Christ N., Siaud N., Egashira A., Wu H., Jasin M.: *Cell* 145, 529 (2011).

## VPLYV APOPTOTICKÝCH INHIBÍTOROV NA EXPRESIU APOPTOTICKÝCH GÉNOV A PREŽÍVANIE ĽUDSKÝCH GLIÁLNYCH BUNIEK

**EVA BLAHOVCOVÁ, PETER RAČAY, RADOVAN  
MURÍN, DUŠAN DOBROTA, JOZEF HATOK**

*Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4, 03601 Martin, Slovensko  
evablahovcova@yahoo.com*

Multiformný glioblastóm (GBM) je najčastejšie sa vyskytujúcim a biologicky najagresívnejším druhom mozgového nádoru u dospelých. Prognóza pre pacientov je horšia v porovnaní s inými nádormi mozgu, pričom chemorezistencia predstavuje jeden z hlavných problémov. Nekontrolovaný rast gliálnych buniek môže byť indukovaný dereguláciou apoptotickej dráhy, čo má významný vplyv na progres GBM.

Anti-apoptotické inhibitory pôsobia selektívne, ABT-737 (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl), BH3I (Bcl-xl), MIM1 (Mcl-1) a predstavujú potenciálne nové možnosti v terapii GBM. Hlavným cieľom štúdie bolo stanoviť vplyv apoptotických inhibítorov na prežívanie ľudských gliálnych buniek a sledovať zmenu v expresii apoptotických génov GBM buniek.

Výsledky prvej časti štúdie poukázali na základe cytotoxického metyl-tiazol tetrazoliového testu (MTT) na relatívnu rezistenciu glioblastómovej bunkovej línie (T98G) a bunkovej línie astrocytov (NHA) na apoptotické inhibitory BH3I a MIM1 (individuálne), zatiaľ čo ABT-737 mal výrazný inhibičný vplyv na rast gliálnych buniek (T98G, NHA).

V druhej časti štúdie sme kvantifikovali expresiu génov asociovaných s apoptózou (n=93) pomocou TaqMan<sup>®</sup> Human Apoptosis Array u glioblastómovej bunkovej línie T98G. Identifikovali sme 12 potenciálne apoptotických génov, ktoré preukazovali v skupine ovplyvnenej niektorým z apoptotických inhibítorov viac ako 2,0-násobnú zmenu v hladinách expresie v porovnaní s intaktnou kontrolou.

Identifikovanie zmien v expresii apoptotických génov môže prispieť k objasneniu patomechanizmu glioblastómovej buniek a umožneniu individuálneho prístupu v liečbe GBM.

*Táto práca vznikla za podpory grantu APVV-0224-12.*

## MORFOGENEZE A VISKOELASTICITA DENTÁLNYCH DIMETHAKRYLÁTOVÝCH SÍTÍ

**ZDENĚK BYSTRICKÝ<sup>a</sup>, JOSEF JANČÁŘ<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno

<sup>b</sup>CEITEC – Středoevropský technologický institut, VUT v

Brně, Technická 10, 616 00 Brno

xcbystricky@fch.vutbr.cz

Dimethakrylátové kopolymerní sítě nachází v současné době široké využití jako matrice kompozitních materiálů v oblasti záchovné stomatologie. Studie zahrnuje monomery typicky využívané v oblasti zubního lékařství, rigidní aromatický dimethakrylát glycerolátu bisfenolu A (Bis-GMA) a jeho ethoxylovanou formu (Bis-EMA), flexibilní alifatický urethan-dimethakrylátový monomer (UDMA) a nízkoviskózní monomer triethylenglykol-dimethakrylát (TEGDMA), přidávaný do směsí pro zlepšení zpracovatelnosti.

Příspěvek poukazuje na souvislost mezi specifickými strukturálními rysy jednotlivých monomerů, kinetikou morfogeneze sítí a viskoelastickými vlastnostmi vytvrzeného materiálu. V rámci základní charakterizace byly zkoumány systémy tvořené jednak jedním monomerem, jednak systémy založenými na třech různých molárních poměrech základního a nízkoviskózního monomeru.

Kinetika vytvrzování byla studována pomocí diferenční foto-kalorimetrie (DPC), konverze funkčních skupin byla srovnána s výsledky infračervené spektroskopie (FTIR). Viskoelastická síť byla zkoumána pomocí dynamicko-mechanické analýzy (DMA), přičemž výsledky byly interpretovány za použití známých modelů. Data z kinetických analýz poskytují základ pro představu o vývoji supramolekulární struktury sítě. Na základě těchto měření byla vynaložena snaha o vystižení vztahu mezi morfologií a komplexním viskoelastickým modulem. Představa o struktuře vytvrzené sítě byla dále potvrzena pomocí měření kinetiky termického degradačního procesu (TGA).

Vysoká viskozita spojená s tvorbou vodíkových můstků spolu s rigiditou monomerní páteře souvisí se značným snížením polymerační rychlosti ( $R_p$ ), velmi omezenou konverzí funkčních skupin ( $P_{C-C}$ ) a téměř výlučně difúzně řízenou kinetikou síťování (Bis-GMA). Absence hydroxylových skupin (Bis-EMA) či rigidního aromatického jádra (UDMA) vedou k nárůstu polymerační rychlosti ( $R_p$ ) i konverze funkčních skupin ( $P_{C-C}$ ). Rostoucí obsah monomeru TEGDMA vede k pozdějšímu projevu difúzního řízení polymerace, čímž se zvyšuje polymerační rychlost i konverze funkčních skupin. Přítomnost flexibilního monomeru avšak dále souvisí se vznikem strukturální heterogenity charakterizované vznikem domén mikro-gelů. To je spojeno s primární cyklicizací a tvorbou neefektivního zesíťení. Heterogenní morfologie je patrná rozšiřováním spektra relaxačních časů i více-stupňovým degradačním procesem. Koexistence domén s různou hustotou zesíťení vede k celkovému zhoršení mechanických vlastností.

*Tato práce vznikla za podpory projektu "CEITEC – Central European Institute of Technology; Středoevropský technologický institut." (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).*

## CENTRIOLE DUPLICATION CYCLE: MOLECULAR MECHANISMS AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES

**LUKAS CAJANEK<sup>a</sup>, ERICH NIGG<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Masaryk University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, 62500 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup>Biozentrum, University of Basel, 4055 Basel, Switzerland  
cajanek@med.muni.cz

Centrioles are cylindrical structures that form the centrosome and serve as platform for the outgrowth of primary cilia. Effective control of centriole duplication cycle is essential for embryogenesis, tissue homeostasis, and genome stability<sup>1,2</sup>.

Primary cilium serves as antenna to receive signals from extracellular space and thus plays important roles in both development and disease. Ciliogenesis is known to depend on matured centrioles, known as basal bodies. Even though major steps of ciliogenesis have been described at a morphological level several decades ago, the underlying mechanisms and their regulation remain insufficiently understood. In the presented study<sup>3</sup> we focused on the role Cep164, a component of basal bodies-specific distal appendages that is crucial for ciliogenesis. I show that loss of Cep164 leads to defects in early steps of primary cilia formation, due to the impaired localization of TTBK2 (Tau tubulin kinase 2), a kinase essential for the assembly of primary cilium. I further show that Cep164 and TTBK2 form a complex and that formation of this complex and hence proper positioning of TTBK2 is crucial for ciliogenesis<sup>3</sup>.

In second part I draw your attention to the regulation of Polo-like kinase 4 (Plk4), a member of the Polo-like kinase family and a key regulator of centriole duplication cycle. I report that a member of RING E3 ligase family is novel binding partner of Plk4. Moreover, I show that this E3 ligase acts upstream of Plk4 and promotes its ubiquitination. This in turn regulates centrosomal levels of Plk4, resulting in the block of Plk4-mediated centriole duplication. Together, this data pinpoint a new regulatory aspect involved in centriole biogenesis.

*Support from FEBS long term fellowship, University of Basel, and SoMoPro grant is sincerely acknowledged.*

### REFERENCE

1. Nigg E.A., Raff J.W.: *Cell*. 134, 4 (2009).
2. Nigg E.A., Cajanek L., Arquint C.: *FEBS Lett*. 588, 15 (2014).
3. Cajanek L., Nigg E.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 28 (2014).

**INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENČÍCH KINAS:  
VLIV NA MNOHOČETNOU LÉKOVOU REZISTENCI****DANIĚLA ČÍHALOVÁ, MARTINA ČEČKOVÁ,  
FRANTIŠEK ŠTAUD***Univerzita Karlova v Praze, FarmF, Katedra farmakologie a  
toxikologie, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové  
cihad6aa@faf.cuni.cz*

Cyklin-dependentní kinasy hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a v posledních letech se staly významným terapeutickým cílem protinádorové léčby. Jejich inhibitory jsou testovány v různých fázích klinického zkoušení; mezi tyto látky patří například dinacliclib, flavopiridol, palbociclib nebo SNS-032. Mnohočetná léková rezistence, často způsobená sníženou retencí léčiva v nádorové buňce, je významnou překážkou úspěšné protinádorové terapie. ABC (ATP-binding cassette) efluxní transportéry, především P-glykoprotein (ABCB1), breast cancer resistance protein (ABCG2) a multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1), navozují rezistenci aktivním transportem cytotoxického léčiva z nádorové buňky. Naším cílem bylo objasnit, zda inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKi) interagují s danými ABC transportéry (ABCB1, ABCG2 a ABCC1) a jestli tyto případné interakce mohou ovlivnit antiproliferativní účinek konvenčních protinádorových léčiv. Pomocí akumulčních a cytotoxicitních metod v transdukovaných MDCKII buněčných liniích, exprimujících jednotlivé lidské transportéry ABCB1, ABCG2 a ABCC1, jsme zjistili, že námi testované látky (dinacliclib, flavopiridol, palbociclib a SNS-032) jsou inhibitory alespoň dvou testovaných ABC transportérů a díky svému inhibičnímu potenciálu mají schopnost zvrátit mnohočetnou lékovou rezistenci. V terapii nádorů jsou léčiva často podávána v kombinaci za účelem zvýšení účinku a snížení rizika vzniku lékové rezistence. Proto jsme dále testovali hypotézu, zda souběžné podání CDKi se schopností inhibovat ABC transportér a cytotoxického substrátu tohoto transportéru navodí synergický antiproliferativní efekt. K tomuto účelu byla využita metoda kombinačního indexu dle Chou-Talalay. Synergický efekt byl pozorován u všech kombinací studovaných CDKi s daunorubicinem (substrát ABCB1 a ABCC1) a topotecanem (substrát ABCG2) na nádorových buněčných liniích exprimujících dané transportéry (HepG2, T47D, MCF-7). Naše studie prokázala, že CDKi mají schopnost překonat mnohočetnou rezistenci inhibicí lékových transportérů a potencovat tak antiproliferativní účinek současně podávaných konvenčních protinádorových léčiv. Tato zjištění by měla být brána v potaz při zavádění CDKi do klinické praxe.

*Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity  
Karlovy (SVV/2014/260064).***DETEKCE A KVANTIFIKACE ISOFORM SILNĚ  
BAZICKÉHO ANTIMIKROBIÁLNÍHO PEPTIDU  
APIDAECINU 1 A JEHO FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM  
V HUMORÁLNÍ IMUNITĚ VČEL****JIRÍ DANIHLÍK<sup>a,b</sup>, RENÉ LENOBEL<sup>b</sup>, MAREK  
ŠEBELA<sup>b</sup>, MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a</sup>***<sup>a</sup>Katedra biochemie, PřF, Univerzita Palackého; <sup>b</sup>Oddělení  
biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná  
pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF, Univerzita  
Palackého, 783 71 Olomouc  
jiri.danihlik@upol.cz*

Antimikrobiální peptidy jsou důležitou součástí humorální imunity všech organismů, vykazují aktivitu proti bakteriím, houbám i jiným organismům<sup>1</sup>. U včel jako sociálního hmyzu se vyvinulo několik úrovní imunitního systému včetně složky humorální, na které se podílejí proteiny jako enzym fenoloxidas a nebo lektiny a antimikrobiální peptidy<sup>2</sup>. Významnou skupinou antimikrobiálních peptidů včel jsou apidaeciny, které jsou účinné proti Gram-negativním bakteriím<sup>3</sup>. Jedná se o silně bazické peptidy (pI ~ 11) bohaté na prolin a arginin (celkově složené z 18 aminokyselin), což jsou vlastnosti komplikující jejich detekci i kvantifikaci v biologických vzorcích<sup>3</sup>. Pro apidaecin 1 byly popsány isoformy apidaecin 1a a 1b (GNNRPVYIPQRPHPRI/L)<sup>3</sup>. Byla optimalizována metoda jejich detekce a kvantifikace založená na zachycení peptidů pomocí slabého katexu a následného odsolení na C8 extrakčním disku pro analýzu vzorků včel včetně hemolymfy z jednotlivých včel nebo konkrétních částí těl. Analytické stanovení koncentrace peptidů ve vzorku je provedeno pomocí nLC-MS instrumentace<sup>4</sup>. K eliminaci ztrát synteticky připraveného standardu apidaecinu při přípravě kalibrační řady byl jako matrice pro rozpuštění peptidu použit homogenát čerstvě vylihnutých včel (mladušek), ve kterých je hladina apidaecinu 1 pod limitem detekce. Validovaná metoda byla použita ke kvantifikaci apidaecinu 1 v hemolymfě úlových včel (13,0 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 95 % konfidenční intervaly 7,5-18,6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), v hrudnicích (36,2 ng kus<sup>-1</sup>, 95% KI: 18,9-53,6 ng kus<sup>-1</sup>) a hlavách včel (12,9 ng kus<sup>-1</sup>, 95% KI: 9,1-16,7 ng kus<sup>-1</sup>). Aplikace nové metody pro kvantifikaci apidaecinu 1 a dalších antimikrobiálních peptidů má velký potenciál využití v základním výzkumu imunity včel, neboť dosud byla kvantifikována pouze genová exprese peptidů<sup>2</sup>. Kromě toho může být optimalizovaná analytická strategie využita i při kvantifikaci jiných silně bazických peptidů.

*Podpořeno z projektu: LO1204 (Národní program  
udržitelnosti I, poskytovatel MŠMT).***LITERATURA**

1. Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z.: Peptides 37, 207 (2012).
2. Danihlik J., Aronstein K., Petřivalský M.: J. Apicult. Res., v tisku.
3. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P.: EMBO J. 8, 2387 (1989).
4. Danihlik J., Šebela M., Petřivalský M., Lenobel R.: J. Chromatogr. A 1374, 134 (2014).

## ÚLOHA microRNA V ŘÍZENÍ BUNĚČNÉHO DĚLENÍ A DIFERENCIACE LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK DO NEURÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK.

**DÁŠA DOLEŽALOVÁ, ALEŠ HAMPL**

Ústav histologie a embryologie, LF MU, Kamenice 3, 62500 Brno  
dasa.dolezalova@gmail.com

Malé nekódující RNA molekuly (miRNA) byly identifikovány jako klíčové molekuly v post-transkripční regulaci genové exprese<sup>1</sup>. Bylo také zjištěno, že miRNA jsou úzce spojeny s fyziologií lidských embryonálních kmenových (EK) buněk<sup>2</sup> a pravděpodobně sehrávají důležitou roli v regulaci jejich dvou klíčových vlastností - sebeobnově a schopnosti diferencovat se. Důležité je, že zachování pluripotence a sebeobnovy lidských EK buněk úzce souvisí s regulací průchodu buněk buněčným cyklem<sup>3</sup>. Jakou roli v tomto propojení hrají miRNA, není přesně popsáno.

Cílem tohoto projektu je studovat úlohu miRNA v řízení diferenciaci lidských EK buněk do neurálních kmenových buněk (NKB). Předpokládáme, že některé miRNA, jejichž hladina se specificky zvyšuje s diferenciací, regulují buněčný cyklus a neomezený růstový potenciál u NKB. Předběžná data ukazují některé miRNA se zvýšenou expresí u NKB (př. miR-21, miR-221, miR-125, a j.) patří do skupiny tzv. „oncomiR“ a byly asociovány s různými druhy rakoviny. Jejich studium v přirozeném vývoji na buněčné úrovni tak může přispět k odhalení kandidátních genů pro léčbu nádorových onemocnění.

Tato práce vznikla za podpory grantu GJ-15-18316Y a MUNIA/1558/2014

### LITERATURA

1. Bartel D. T., Chen C.: Nat. Rev. Genet. 5, 5 (2004).
2. Doležalová D., Mráz M., Bárta T., Plevová K., Vínarský V., Holubcová Z., Jaroš J., Dvořák P., Pospíšilová Š., Hampl, A.: Stem Cells 30, 7 (2012).
3. Bárta T., Doležalová D., Holubcová Z., Hampl, A.: Exp. Biol. Med. 238, 3 (2013).

### ANALÝZA VPLYVU rs295654:G>C A rs3735520:G>A NA FENOTYP PACIENTOV S KERATOKÓNUSOM

**LUBICA ĎUĐÁKOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ KLEMA<sup>b</sup>, KATEŘINA JIRSOVÁ<sup>a</sup>, PETRA LIŠKOVÁ<sup>ac</sup>**

<sup>a</sup> Laboratoř biologie a patologie oka, ÚDMP, 1. LF UK a VFN, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2; <sup>b</sup> Katedra počítačů, FEL ČVUT, Technická 2, 166 27 Praha 6; <sup>c</sup> Oční klinika, VFN a 1. LF UK, U nemocnice 2, 128 08 Praha 2  
dudakova.lubica@gmail.com

Keratokónus (KC) je nezápalové ochorenie rohovky, pri ktorom dochádza k jej stenčovaniu a kónickému vykleňovaniu<sup>1</sup>. Asociácia 4 SNPs (jednonukleotidových polymorfizmov) v géne pre lyzyl oxidázu (*LOX*) a 3 SNPs v hepatocytárnom rastovom faktore (*HGF*) a zvýšeného rizika pre rozvoj keratokónu bola v minulosti popísaná u pacientov z USA, Austrálie a Severného Írska<sup>2,3</sup>. V českej populácii sme potvrdili asociáciu SNPs rs295654:G>C v intróne génu *LOX* s protektívnym účinkom na vznik ochorenia a rs3735520:G>A v promótoře génu *HGF* ako rizikový faktor pre rozvoj KC<sup>4</sup>. Naším ďalším cieľom bolo poodhaliť mechanizmus vplyvu rizikových SNPs na imunohistochemickej úrovni (lokalizácia a množstvo proteínov *LOX* a *HGF*) a na úrovni klinickej.

Na funkčnú analýzu vplyvu SNPs pomocou nepriamej fluorescenčnej imunohistochemie sme použili 15 KC a 7 kontrolných rohoviek. Spracovali sme klinické údaje od 165 pacientov zaradených do genotypovania – vek, genotyp pacienta (prítomnosť rizikovej a protektívnej alely), nástup ochorenia a klinické parametre (získané na prístroji Pentacam) zvlášť pre pravé a ľavé oko - hrúbka rohovky v centre, najtenší bod, stupeň keratokónu. Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené pomocou „R package“ pre celogenómové asociačné štúdie SNPassoc<sup>5</sup>. Odhad *P*-hodnôt a intervalov spoľahlivosti je založený na teste pomerom vierohodnosti.

Aj keď sme v niektorých KC vzorkách pozorovali zníženie a nepravidelnosť signálu oboch proteínov v porovnaní s kontrolnými vzorkami, nebolo možné jednoznačne priradiť zmeny ku genotypu. Po štatistickej analýze klinických dát sme našli koreláciu rs295654:G>C so stupňom KC pre pravé oko (*P* = 0,0439). Táto korelácia sa však neprejavila pre oko ľavé a preto ju považujeme za nepreukaznú.

Nepodarilo sa nám preukázať priamy vplyv SNPs rs295654:G>C a rs3735520:G>A na fenotyp ochorenia. Predpokladáme, že SNPs nájdené v génoch *LOX* a *HGF* nie sú jediné, ktoré sa podieľajú na vzniku a progresii KC a bude nutné nájsť ďalšie faktory asociované so vznikom tohto ochorenia.

Táto práca vznikla za podpory GAUK č. 562313/2013, PRVOUK-P24/LF1/3 a grantu MZ ČR NT14539.

1. Kennedy R.H., Bourne W.M., Dyer J.A.: Am. J. Ophthalmol. 101, 267 (1986).
2. Bykhovskaya Y., Li X., et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53, 4152 (2012).
3. Burdon K.P., Macgregor S., et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52, 8514 (2011).
4. Dudakova L., Palos M., et al.: Eur. J. Human Mut., 2015, prijaté k publikácii.
5. Gonzales J.R., Armengol L., et al.: Bioinformatics 23, 654 (2007).

## ZNAČNÉ ROZDÍLY V MEIOTICKÝCH REKOMBINACÍCH U HOSPODÁŘSKY VÝZNAMNÝCH DRUHŮ S BLÍZCE PŘÍBUZNÝMI KARYOTYPY

**JAN FRÖHLICH<sup>a</sup>, MILUŠE VOZDOVÁ<sup>a</sup>, SVATANA KUBIČKOVÁ<sup>a</sup>, HALINA ČERNOHORSKÁ<sup>a</sup>, HANA ŠEBESTOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ VAHALA<sup>b</sup>, JIŘÍ RUBEŠ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Central European Institute of Technology – VÚVL, Hudcova 70, 621 00 Brno; <sup>b</sup>ZOO Dvůr Králové, Štefánikova 1029, 544 01 Dvůr Králové nad Labem  
frohlich@vri.cz

Rekombinace a synapse homologních chromozomů hraje klíčovou roli při správné tvorbě gamet a jejich narušení během meiózy je u řady druhů (především savců) spojeno se selháním tvorby životaschopných gamet<sup>1</sup>.

Naše znalosti mechanismu, který určuje počet a polohu rekombinací na ramenech chromozomů není úplně jasný. Nicméně je známo, že věk a pohlaví organismu, délka chromozomů a struktura chromatinu jsou faktory ovlivňující rekombinační četnosti<sup>2,3</sup>.

V naší studii jsme se zaměřili na hodnocení počtu a polohy crossing overů na ramenech synaptonemálních komplexů (SC) a vliv interference u druhů z čeledi Bovidae (Turoviti), kteří se od sebe odlišují různým počtem chromozomů. Vybrány byly hospodářsky významné druhy (Tur domácí, 2n = 60, kmen Bovini; Ovce domácí, 2n = 54 a Koza domácí, 2n = 60, oba z kmene Caprini) a jeden volně žijící zástupce kmene Caprini (Paovce hřivnatá, 2n = 58).

Pro odhad frekvence a lokalizace crossing overu na meiotických chromozomech buněk varlat byla využita technika imunofluorescenční značení proteinu synaptonemálního komplexu 3 (SYCP3) a MLH1 proteinu (eukaryotický homolog bakteriálního mutL), který je součástí rekombinačního komplexu<sup>4</sup>.

Nalezeny byly významné rozdíly ( $P < 0.001$ ) v počtu rekombinací a délce SC nejen mezi zástupci kmene Caprini a býky, ale zaznamenána byla také vysoká vnitrodruhová variabilita. Navzdory nižšímu počtu chromozomů u ovce, je počet MLH1 míst a délka SC nejvyšší ze studovaných druhů. Pomocí FISH se sondami k byčím chromozomům 1, 2, 3, 5, 8 a 11 byla prokázána redukce rekombinací na fúzovaných chromozomech ovce ve srovnání se skotem a kozami. Redukce v počtu rekombinací je způsobena pravděpodobně centromerickou interferencí, jelikož změny v pozicích rekombinací byly pozorovány jen u ovčích metacentrických chromozomů.

### LITERATURA

1. Hassold T., Sherman S., Hunt P.: Hum. Mol. Genet. 9 2409 (2000).
2. Borodin P. M., Karamysheva T. V., Rubtsov N. B.: Cell Tissue Biol. 1, 503 (2007).
3. Mary N., Barasc H., Ferchaud S., Billon Y., Meslier F., Robelin D., Calgaro A.: PLoS ONE 9 e99123 (2014).
4. Barlow A. L., Hultén M. A.: Chromosome Research 4, 562 (1996).

## NOVÝ MECHANISMUS REGULACE SIGNALIZACE KANABINOIDNÍHO RECEPTORU 1

**ALENA HÁJKOVÁ<sup>a</sup>, ŠÁRKA TECHLOVSKÁ<sup>a</sup>, MICHAELA DVOŘÁKOVÁ<sup>a</sup>, DANIELA FRANKOVÁ<sup>a</sup>, PAVLA HUBÁLKOVÁ<sup>a</sup>, LAURENT PREZEAU<sup>b</sup>, JAROSLAV BLAHOŠ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Ústav molekulární genetiky AVČR v.v.i, Videňská 1083, 142 20 Praha; <sup>b</sup> Institut de génomique fonctionnelle, 141, rue de la Cardonille, Montpellier, 340 94 France  
hajkova@img.cas.cz

Kanabinoidní receptor 1 (CB1R) patří do rozsáhlé skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. CB1R se vyskytuje především v neuronech, kde moduluje synaptickou plasticitu a reguluje tak řadu procesů jako jsou kognitivní funkce, udržování energetické rovnováhy, sociální interakce, emoce a paměť. Řada neuronálních a psychických onemocnění vzniká díky poruchám v synaptickém přenosu. Detailní pochopení molekulárního mechanismu synaptické neurotransmise je proto nezbytné pro odhalení příčin mozkových dysfunkcí a k vývoji nových terapeutických přístupů. Molekulární interakce CB1R jsou zkoumány především v souvislosti s poruchami příjmu potravy (obezita, anorexie), drogovou závislostí, bolestí, nespavostí a některými psychickými onemocněními.

S využitím technologie yeast-two hybrid jsme našli nového interakčního partnera CB1R, protein „Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like (endophilin) interacting protein 1” (SGIP1). Jedná se o intracelulární protein, vyskytující se téměř výhradně v mozku, kde se účastní endocytózy. Jeho zvýšená exprese je spojována se vznikem obezity u myších modelů obezity<sup>1</sup>.

Vyvinuli jsme protilátku specificky rozpoznávající SGIP1, s jejíž pomocí jsme ověřili kolokalizaci SGIP1 s CB1R v primárních neuronálních kulturách potkaních kortikálních neuronů. Funkční experimenty v transfekovaných buňkách HEK293 ukázaly, že SGIP1 brání internalizaci aktivovaného CB1R z buněčného povrchu. Signalizace CB1R pomocí G-proteinů je přítomností SGIP1 ovlivněna minimálně, ale asociace CB1R s  $\beta$ -arrestinem 2 je v přítomnosti SGIP1 zvýšena a přetrvává déle. V našich experimentech SGIP1 také moduluje signalizaci aktivovaného CB1R skrze kinasu regulovanou extracelulárním signálem 1/2 (ERK 1/2).

Interakce mezi CB1R a SGIP1 nebyla dosud publikována a může vysvětlit rozpory mezi již publikovanými daty získanými z tkáňových kultur HEK293, neexprimujících SGIP1, a daty získanými z neuronálních kultur, kde je SGIP1 přítomen endogenně. Jedná se o nový způsob modulace signalizace CB1R, který ovlivňuje pouze specifické signální dráhy.

### LITERATURA

1. Trevaskis J., Walder K., Foletta V., Kerr-Bayles L., McMillan J., Cooper A., Lee S., Bolton K., Prior M., Fahey R., Whitecross K., Morton G. J., Schwartz M. W., Collier G. R.: Endocrinology 146, 3757 (2005).



## MALÁ RNA M<sub>s1</sub> VÁŽE RNA POLYMERASU V MYKOBAKTERIÍCH

**JARMILA HNILICOVÁ, JITKA JIRÁT  
MATĚJČKOVÁ, MICHAELA ŠIKOVÁ, PETR  
HALADA, LIBOR KRÁSNÝ**

*Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., 142 20 Praha 4 – Krč  
hnilicova@biomed.cas.cz*

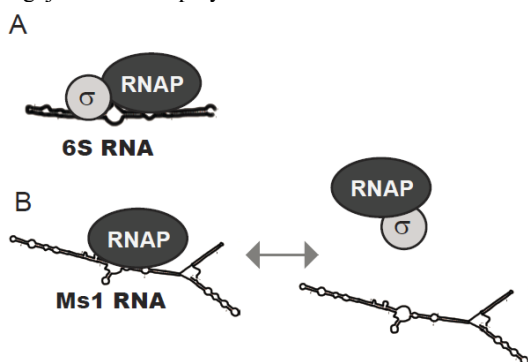
Bakterie zůstávají většinu svého života ve stacionární fázi růstu. Adaptace na stacionární fázi je tudíž nezbytná pro jejich přežití a také pro přežití patogenních bakterií v hostitelích. Naším cílem je zjistit, jak je regulována transkripce během stacionární fáze růstu bakterie *Mycobacterium smegmatis*, která je příbuzná patogenním mykobakteriím.

Našli jsme novou malou RNA, M<sub>s1</sub>, která je přítomná ve velkém množství ve stacionární fázi růstu u *M. smegmatis*. Pomocí ultracentrifugace v glycerolových gradientech, RNA imunoprecipitace a vytažení vazebných partnerů biotinylovanou M<sub>s1</sub> ukazujeme, že M<sub>s1</sub> váže RNA polymerasu. Tato RNA polymerasa je bez hlavního sigma faktoru nebo jakéhokoliv jiného sigma faktoru.

U ostatních bakterií je klíčovou regulační molekulou ve stacionární fázi 6S RNA, která inhibuje RNA polymerasu v komplexu s hlavním sigma faktorem a tím mění genovou expresi. M<sub>s1</sub> váže pouze RNA polymerasu bez sigma faktoru a její funkce byla doposud neznámá.

Rozdíl mezi M<sub>s1</sub> a 6S RNA odráží rozdíl ve složení transkripčních komplexů mezi mykobakteriemi a dalšími druhy bakterií. Na rozdíl od *Escherichia coli*, buňky *M. smegmatis* ve stacionární fázi růstu obsahují poměrně málo molekul RNA polymerasy v komplexu s hlavním sigma faktorem.

M<sub>s1</sub> tak představuje nový typ malých RNA interagujících s RNA polymerasou.



Obr. 1. Zatímco u většiny bakterií 6S RNA váže RNA polymerasu s hlavním sigma faktorem (A), u mykobakterií M<sub>s1</sub> váže RNA polymerasu bez sigma faktoru (B).

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 13-27150 a P305/12/G034.*

## DVOUFÁZOVÁ RECYKLACE VYSOCE FLUOROVANÝCH RUTHENIOVÝCH KATALYZÁTORŮ METATEZE ALKENŮ

**JAN HOŠEK, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ, JAROSLAV  
KVÍČALA**

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

Extrakce do fluorovaného rozpouštědla je charakteristickou separační metodou těžké fluorové chemie. Pro recyklaci ruthenioých prekatalyzátorů však zatím nebyla využita.

V naší laboratoři se zabýváme syntézou nových polyfluorovaných analogů ruthenioých komplexů, které jsou vysoce fluorofilní a současně si zachovávají vysokou reaktivitu podobnou komerčně dostupným katalyzátorům<sup>1</sup>. Mezi poslední vysoce fluorované komplexy patří **I-IV**, jejichž společným rysem je substituce v pozici 4 a 5 imidazolidinového cyklu a v *para*-poloze aromatických cyklů NHC ligandu (Schéma 1).

Klíčovým krokem přípravy těchto komplexů byla stereoselektivní adice 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluoroktyllithia na sérii polyfluorovaných diiminů a cyklizace vzniklých diaminů s triethyl-orthoformiátem. Připravené dihydroimidazoliové soli poskytly reakci s Hoveydoým-Grubbovým prekatalyzátorem 1. generace nebo jeho perfluoralkylovanou variantou vyvinutou v naší laboratoři čtyři nové vysoce fluorované komplexy **I-IV**. Aktivita připravených katalyzátorů byla úspěšně testována v modelových metatezích alkenů s uzavřením cyklu (RCM).

Nejvýznamnějším výsledkem je využití termomorfních vlastností rozpouštědlové směsi polyfluorované/nefluorované rozpouštědlo, které umožnilo úspěšnou několikanásobnou recyklaci aktivní katalytické formy. Jedná se o světově první známé využití separačních metod těžké fluorové chemie v metatezi alkenů a první známou funkční aplikaci fluorofilního NHC ligandu.

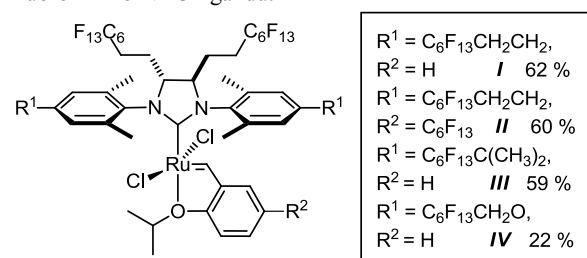


Schéma 1. Nové rutheniové komplexy **I-IV**

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 207/10/1533 a MŠMT č. 20/2014.*

### LITERATURA

1. Kvíčala J., Schindler M., Kelbichová V., Babuněk M., Rybáčková M., Kvíčalová M., Cvačka J., Březinová A.: *J. Fluorine Chem.* 153, 12 (2013).

**ENDOGENNÍ RETROVIRUS JELENCE (*Odocoileus hemionus*): UNIKÁTNÍ MODEL PRO STUDIUM VIROVÉ ENDOGENIZACE**

**TOMÁŠ HRON, HELENA FÁBRYOVÁ, DANIEL ELLEDER**

*Ústav molekulární genetiky AV ČR, Oddělení virové a buněčné genetiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
tomas.hron@img.cas.cz, daniel.elleder@img.cas.cz*

Endogenní retroviry (ERVs) jsou mobilní genetické elementy tvořící významnou část všech doposud známých genomů obratlovců. K jejich vzniku dochází při integraci exogenního viru do zárodečné buněčné linie, což vede k vertikálnímu přenosu virové DNA do dalších generací jako součást genomu hostitele. Krátce poté zpravidla dochází ke zmnožení počtu virových integrací v genomu. Některé virové integrace mohou být následně fixovány v hostitelské populaci, kde jsou tyto „virové fosilie“ uchovány po mnoho milionů let. Většina ERVs je poškozena v důsledku rekombinace a akumulace mutací a intaktní genetickou informaci si zachovalo jen velmi málo, převážně mladších, ERVs. Ukazuje se, že právě tyto virové integrace hrají klíčovou roli v některých buněčných procesech a rozvoji patologií<sup>1</sup>. Přestože výzkum ERVs v posledních letech výrazně pokročil, mechanismus jejich vzniku je stále velmi málo pochopen.

Předmětem našeho zkoumání je nově objevený endogenní gammaretrovirus v genomu jelence, CrERV $\gamma$  (Cervid Endogenous Gammaretrovirus)<sup>2</sup>. CrERV $\gamma$  je evolučně mladý endogenní retrovirus, který vykazuje extrémní polymorfismus v integračním profilu jednotlivých jedinců populace. To naznačuje, že k jeho integraci došlo v nedávné historii, nebo k ní dokonce stále dochází. Pomocí dříve publikované metody kokultivace primární buněčné linie jelence s lidskou linií<sup>3</sup> se nám podařilo indukovat infekční variantu tohoto viru, jehož sekvence se shoduje s evolučně mladými integracemi v genomu jelence. To naznačuje, že se jedná o stále aktivní virus. Naše práce se dále zabývá studiem interakcí tohoto viru s hostitelem a zkoumá podmínky jeho infekivity.

CrERV $\gamma$  je unikátní model evolučně mladého a aktivního endogenního retroviru, který lze studovat v jeho infekční formě. Jeho bližší charakterizaci lze přispět k poodhalení vztahů mezi endogenními retroviry a hostitelem, které jsou v současnosti stále velmi málo pochopeny.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR LK11215.*

**LITERATURA**

1. Solyom S., Kazazian H.H.: *Genome Med.* 4, 8 (2012).
2. Elleder D., Kim O., Padhi A., Bankert J.G., Simeonov I., Schuster S.C., Wittekindt N.E., Motameny S., Poss M.: *J. Virol.* 86, 5 (2011).
3. Aaronson S.A., Tronick S.R., Stephenson J.R.: *Cell* 9, 48 (1976).

**KOVALENTNÍ-ORGANICKÉ SÍŤE OBSAHUJÍCÍ PORFYRINOVÉ MOLEKULY**

**JAN HYNEK<sup>a,b</sup>, JIŘÍ RATHOUSKÝ<sup>c</sup>, PAVEL KUBÁT<sup>c</sup>, JAN DEMEL<sup>a</sup>, KAMIL LANG<sup>a\*</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav anorganické chemie AV ČR, v. v. i., 250 68 Řež,  
<sup>b</sup>Katedra anorganické chemie, PřF Univerzity Karlovy v Praze, 128 43 Praha 2, <sup>c</sup> Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v. v. i., 182 23 Praha 8  
hynek@iic.cas.cz*

Kovalentní-organické sítě (COF) jsou porézní materiály složené z kovalentně vázaných organických stavebních bloků, jež mohou být spojeny C–C vazbou tvořenou couplingovou reakcí, C=N vazbou tvořenou při vzniku Schiffovy báze, triazinovou jednotkou vznikající reakcí tří –CN skupin, boronylesterovou skupinou vznikající reakcí tří molekul boronové kyseliny atd. COF jsou studovány jako materiály s možnými aplikacemi pro uskladnění plynů, heterogenní katalýzu a optoelektroniku. Uspořádanost COF se liší podle způsobu jejich přípravy; reverzibilní reakce (např. tvorba Schiffovy báze nebo boronylesteru) vedou ke vzniku materiálů s lepší krystalinitou oproti COF vzniklým nereverzibilními reakcemi (typicky couplingové reakce)<sup>1</sup>.

Předmětem naší práce je příprava série COF obsahujících porfyrinové molekuly pomocí Suzukiho cross-couplingové reakce nebo tvorby Schiffovy báze. Byly připraveny materiály s různou geometrií uspořádání v závislosti na použitých stavebních blocích; použití planárních tetrasubstituovaných porfyrinů vedlo k přípravě 2D COF, zatímco disubstituované porfyriny v kombinaci s tetrasubstituovaným tetrafenylmethanem poskytly 3D COF. Připravené materiály byly charakterizovány pomocí MAS-NMR, IR spektroskopie, termální analýzy a elementární analýzy. Pomocí adsorpce dusíku při teplotě 77 K bylo zjištěno, že specifický povrch materiálů dosahuje až 562 m<sup>2</sup>/g. Fotofyzikální vlastnosti COF zahrnující absorpční a fluorescenční spektra, časově rozlišenou fluorescenci a produkci singletového kyslíku jsou závislé na geometrii materiálů a použitém porfyrinovém prekurzoru. Nami připravené COF jsou perspektivními materiály pro fotosenzitizaci a katalytické aplikace.

**LITERATURA**

1. Feng X., Ding X., Jiang D.: *Chem. Soc. Rev.* 41, 6010 (2012).

## REOLOGICKÁ STUDIE TERMOCITLIVÉ POLYMERNÍ PASTY OBSAHUJÍCÍ „CORE-SHELL“ NANOČÁSTICE

**IVANA CHAMRADOVÁ<sup>a,b</sup>, LUCY VOJTOVÁ<sup>b</sup>,  
JOSEF JANČÁŘ<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> Ústav chemie materiálů, Fakulta chemická VUT v Brně,  
612 00 Brno; <sup>b</sup> CEITEC - Středoevropský technologický  
institut VUT, 616 00 Brno  
xcchamradova@fch.vutbr.cz

Předložená práce je zaměřena na přípravu a reologickou studii termocitlivé biodegradabilní polymerní pasty obsahující nanočástice „core-shell“ (jádro-obal), skládající se z polymerního biodegradabilního obalu a anorganického bioaktivního nano-plniva hydroxyapatitu (n-HAp). Termocitlivá polymerní matrice se skládá z hydrofóbního kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a hydrofilního poly(ethylen glykolu) (PEG)<sup>1</sup>.

„Core-shell“ částice (CS) byly připraveny dvouemulzní metodou s použitím chemického síťovačla, které je schopno síťovat karboxylové skupiny přítomné na koncích polymerního řetězce. CS částice byly charakterizovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a dynamického rozptylu světla (DLS)<sup>2</sup>.

Původní termocitlivá matrice vykazovala dva fázové přechody při rostoucí teplotě, a to přechody sol-gel a gel-suspenze. Po přidání CS částic (5 a 10 hm.%) do polymerní matrice se elastický modul pružnosti ve smyku zvýšil z původních 40 na 150 Pa a stejně tak se zvýšila i teplota maxima tuhosti kompozitu z 33,5 na 40,5 °C. Po přidání 20 hm.% CS ztratil již kompozit termocitlivé vlastnosti a byl dále jen ve fázi gelu. Připravená termocitlivá biodegradabilní polymerní kompozitní pasta může nalézt své uplatnění v tkáňovém inženýrství, zvláště jako implantáty *in situ* a v neposlední řadě jako nosič léčiv.

Tato práce vznikla za podpory projektu CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

### LITERATURA

- Alexander A., Ajazuddin, Khan J., Saraf S., Saraf S.: J. Contr. Release. 172, 715 (2013).
- Chamradova, I., Vojtova, L., Michlovska, L., Jančář, J.: Termogelační kompozitní pasta. Užité vzor číslo 2014/396; 18. prosinec 2014.

## ALKALOIDY Z *Fumaria officinalis* A JEJICH BIOLOGICKÉ AKTIVITY VZTAŽENÉ K ALZHEIMEROVĚ CHOROBE

**JAKUB CHLEBEK<sup>a</sup>, ZDENĚK NOVÁK<sup>b</sup>, MARCELA  
ŠAFRATOVÁ<sup>a</sup>, DANIELA HULCOVÁ<sup>a</sup>, ANNA  
HOŠŤÁLKOVÁ<sup>a</sup>, KATEŘINA MACÁKOVÁ<sup>a</sup>,  
MIROSLAV LOČÁREK<sup>a</sup>, PAVLÍNA NOVOTNÁ<sup>c</sup>,  
MARIE URBANOVÁ<sup>c</sup>, LUBOMÍR OPLETAL<sup>a</sup>, JIŘÍ  
KUNEŠ<sup>b</sup>, LUCIE CAHLÍKOVÁ<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, ADINACO  
Research Group; <sup>b</sup>Katedra anorganické a organické chemie,  
Univerzita Karlova, FarmG, 50005 Hradec Králové;  
<sup>c</sup>Ústav fyziky a měřicí techniky, VŠCHT Praha, 16628 Praha  
jakub.chlebek@faf.cuni.cz

Dva nové isochinolinové alkaloidy fumaranin a fumarostrejdin, spolu s dalšími 18 známými alkaloidy, byly izolovány z nadzemních částí *Fumaria officinalis* (Papaveraceae). Struktura izolovaných sloučenin byla objasněna na základě spektroskopických analýz a porovnáním získaných dat s údaji v literatuře. Absolutní konfigurace nových sloučenin byla určena porovnáním jejich CD spekter se spektry známých analogických sloučenin. Sloučeniny izolované v dostatečném množství byly testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase a GSK-3 $\beta$ <sup>1-3</sup>. Alkaloidy parfumidin a sinaktin vykazovaly potentní inhibiční prolyloligopeptidasy (IC<sub>50</sub> 99 ± 5  $\mu$ M a 53 ± 2  $\mu$ M, respektive).

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu Univerzity Karlovy – projekt UNCE 17/2012 a projektu TEAB č. CZ.1.07/2.3.00/20.0235.

### LITERATURA

- Ellman L., Courtney D., Andreas V., Featherstone R.: Biochem. Pharm. 7, 88 (1961).
- Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L.: Nat. Prod. Commun. 8, 1541 (2013).
- Baki A., Bielik A., Molnár L., Szendrei G., Keserü G.M.: Assay Drug Dev. Technol. 5, 75 (2007).

## IN VITRO TESTOVÁNÍ OSTEOGENNÍCH VLASTNOSTÍ TITANOVÉ SLITINY S POVRCHOVOU NANOÚPRAVOU

**EVA JABLONSKÁ<sup>a</sup>, JAROSLAV FOJT<sup>b</sup>, PENELOPE  
M. TSIMBOURI<sup>c</sup>, JAN LIPOV<sup>a</sup>, LUDĚK JOSKA<sup>b</sup>,  
MATTHEW J. DALBY<sup>c</sup>, TOMÁŠ RUML<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie; <sup>b</sup>Ústav kovových  
materiálů a korozního inženýrství, VŠCHT Praha, 166 28  
Praha 6, <sup>c</sup>Centre for Cell Engineering, University of  
Glasgow, Scotland, UK  
jablonse@vscht.cz

Moderní doba klade stále zvyšující se požadavky na materiály používané pro trvalé implantáty v ortopedii. Titan a jeho slitiny se vyznačují dobrými mechanickými vlastnostmi a jsou v těle dobře snášeny, jsou však považovány za bioinertní. Za účelem urychlení hojení a lepší integrace implantátu jsou prováděny různé povrchové úpravy. Jednou z možností je příprava nanotrubic *in situ* pomocí anodické oxidace v přítomnosti fluoridových iontů. Nanostrukturovaný povrch může mimikovat schopnost extracelulární matrix vyvolat specifické buněčné odpovědi<sup>1</sup>.

Naším cílem je připravit a následně *in vitro* otestovat povrchovou nanoúpravu, která v těle podpoří osteodiferenciaci kmenových buněk migrujících do místa poškození, což může zabránit nežádoucímu vzniku vazivového pouzdra a vést k lepší fixaci implantátu.

Byla testována slitina Ti-6Al-4V s nanotubulární povrchovou úpravou (průměr trubek 50 a 100 nm). S použitím buněčné linie Saos-2 (lidské buňky osteosarkomu) byla testována morfologie a proliferace buněk (fluorescenční mikroskopie po jednom až pěti dnech růstu na materiálu, vizualizace aktinu, stanovení počtu buněk) a také osteogenní vlastnosti materiálu (specifická enzymová aktivita alkalické fosfatasy). Dále byla s použitím lidských stromálních buněk kostní dřenež testována morfologie a adheze (fluorescenční mikroskopie po třech dnech, vizualizace aktinu a vinkulinu).

Morfologie i proliferace buněk Saos-2 na vzorcích byla srovnatelná s kontrolou (broušená slitina bez nanostruktury), stejně tak nebyly pozorovány rozdíly v aktivitě alkalické fosfatasy. Při použití vhodnějšího modelu (primární stromální buňky kostní dřenež) byla na testovaných materiálech pozorována po třech dnech snížená adheze buněk, což naznačuje potenciální změnu fenotypu a může značit i osteogenní vlastnosti materiálu<sup>2</sup>. Rozhodující budou následné testy s kmenovými buňkami na diferenciaci (stanovení markerů diferenciaci pomocí qPCR a imunofluorescenční mikroskopie po čtyřech týdnech kultivace).

Tato práce vznikla za podpory grantu TAČR (č. TE01020390) a MŠMT ČR (č. 20/2015).

#### LITERATURA

1. Dalby M.J., Gadegaard N., Oreffo R.O.C.: Nat. Mater. 13, 558 (2014).
2. Oh S., Brammer K.S., Li Y.S.J., Teng D., Engler A.J., Chien S., Jin S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 2130 (2009).

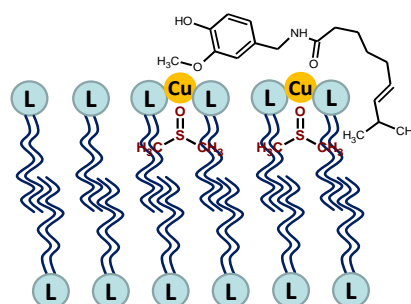
### PŘENOS KAPSAICINU PŘES FOSFOLIPIDOVÉ MEMBRÁNY POMOCÍ DIMETHYLSULFOXIDU

**JANA JAKLOVÁ DYTRTOVÁ<sup>a\*</sup>, MICHAL JAKL<sup>b</sup>, TOMÁŠ NAVRÁTIL<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6; <sup>b</sup> Dept Agro-Environ. Chem. Plant Nutr., Faculty of Agrobiolology, Food and Natural Resources, Česká zemědělská univerzita v Praze, 165 21 Praha 6; <sup>c</sup> Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., 182 23 Praha 8 dytrtova@uochb.cas.cz

Kapsaicin (obr. 1) a kapsaicinoidy se přirozeně vyskytují v částech některých rostlin (chilli) jako repelentní ochrana před býložravci. Této účinné ochrany by bylo možné využít např. pro lesnický významné listnáče, či jedlí, které je velmi obtížné reintrodukovat díky vysokému preferenčnímu okusu zvěří. Zásadním problémem je vlastní přenos kapsaicinu do zelených částí rostlin, tedy primárně jak

vyřešit průchod fosfolipidovou membránou. K otevření biologických membrán by bylo možné využít dimethylsulfoxidu (DMSO)<sup>1</sup>. Mechanismus působení je však komplikován interakcemi s dalšími látkami přítomnými ve vodném prostředí<sup>2</sup>. Tato práce sleduje vliv tvorby komplexů kapsaicinu s kationty mědi na jejich interakci s fosfolipidy za přítomnosti DMSO. Studium takto komplexního systému vychází ze znalostí interakci DMSO s fosfolipidy v plynné fázi (ESI-MS) a interakci Cu s fosfolipidy v plynné fázi a pomocí impedanční spektroskopie. Kapsaicin v přítomnosti Cu interaguje společně: kapsaicin – Cu(II) – fosfolipid (obr. 1). Přítomnost DMSO interakci Cu(II) – fosfolipid oslabuje a napomáhá tak transportu kapsaicinu přes membránu. Kapsaicin je, vzhledem k jeho vysoké afinitě k Cu(II), transportován přes fosfolipidovou membránu ve formě měďnatého komplexu.



Obr. 1. Naznačení systému kapsaicin–Cu(II)–fosfolipid

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 13-21409P.

#### LITERATURA

1. Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J.: J. Am. Chem. Soc. 128, 13982 (2006).
2. Jakl M., Straka M., Jaklová Dytrtová J., Roithová J.: Int. J. Mass Spectrom. 360, 8 (2014).

### VYUŽITÍ FOTOAKTIVOVATELNÝCH NANOSOND A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE KE STUDIU STRUKTURY A TOPOLOGIE CYTOCHROMU P-450 2B4 A CYTOCHROMU b<sub>5</sub>

**TOMÁŠ JEČMEN<sup>a,b</sup>, RENATA PTÁČKOVÁ<sup>a,b</sup>, PETR NOVÁK<sup>a,b</sup>, PETR HODEK<sup>b</sup>, MIROSLAV ŠULC<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha, <sup>b</sup>Univerzita Karlova, Hlavova 8, Praha tomas.jecmen@centrum.cz

V organismu se na detoxikaci cizorodých látek, metabolismu léčiv a bohužel také aktivaci některých karcinogenů podílí systém cytochromů P-450 (P450). Jedním z jejich redoxních partnerů je cytochrom b<sub>5</sub>, který kromě přenosu druhého elektronu v reakčním cyklu P450 může stimulovat jeho katalytickou aktivitu.

Pro studium struktury a interakci obou cytochromů v lipidické membráně jsme vyvinuli metodu síťování iniciovaného UV zářením<sup>1</sup>. Exprimovali jsme fotoaktivovatelnou nanosondou – cytochrom b<sub>5</sub>, jehož 3

methioniny jsou nahrazeny aminokyselinovým analogem foto-methioninem. Ozáření směsi nanosondy a P450 2B4 rekonstituovaných s lipidickou membránou jsme získali kovalentní komplexy o různé stechiometrii. Pro její určení jsme využili komplementárních metodik<sup>2</sup>.

Kovalentní komplexy jsme dále analyzovali pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Za účelem ověření a doplnění strukturálních informací jsme exprimovali 6 mutantních forem cytochromu b<sub>5</sub>, jež každý obsahoval v sekvenci jediný methionin (M126 a M131 pro studium interakcí v prostředí lipidické membrány, M96 pro sledování interakcí flexibilní spojovací domény, a M23, M41 a M46 v katalytické doméně, které nejsou přítomné v „divokém typu“ cytochromu b<sub>5</sub>)<sup>3</sup>. Foto-methioniny zavedené do katalytické domény nanosondy sloužily k porovnání nové metodiky s výsledky získanými pomocí chemického síťování.

Identifikovali jsme dva odlišné způsoby vzájemné orientace obou cytochromů: první umožňuje přenos elektronů z cytochromu b<sub>5</sub> na P450, druhá naopak ze sterických důvodů přenos elektronů neumožňuje, nabízí ovšem možné vysvětlení podstaty modulace katalytických vlastností P450.

Získané strukturální informace budou dále využity pro zpřesňování „in silico“ modelů interakce zkoumaných proteinů.

*Finanční podpora: GAČR P207/12/0627, UNCE 204025/2012.*

#### LITERATURA

1. Koberova M., Jecmen T., Sulc M., Cerna V., Krizek R., Hudecek J., Stiborova M., Hodek P.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 125, 8 (2013).
2. Ječmen T., Ptáčková R., Kavan D., Černá V., Hodek P., Stiborová M., Hudeček J., Šulc M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.*, v tisku.
3. Ječmen T., Ptáčková R., Černá V., Dračínská H., Hodek P., Stiborová M., Hudeček J., Šulc M.: *Methods*, v tisku.

#### ROLE S-NITROSOGLUTATHIONREDUKTASY V OBRANNÉM MECHANISMU BUNĚK TABÁKU PO APLIKACI ELICITINŮ

**TEREZA JENDRIŠÁKOVÁ<sup>a</sup>, PAVLA SATKOVÁ<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, JAN LOCHMAN<sup>b</sup>, TOMÁŠ KAŠPAROVSKÝ<sup>b</sup>, MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Katedra biochemie, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, <sup>b</sup>Ústav biochemie, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika lenka.luhova@upol.cz

Oxid dusnatý (NO) je důležitá signální molekula, která se podílí na imunitní odpovědi u rostlin po napadení mikrobiálními patogeny<sup>1</sup>. S-Nitrosogluthationreduktasa (GSNOR) je známá jako klíčový enzym v metabolismu NO. Reguluje jeho biologickou aktivitu prostřednictvím S-nitrosylace jako posttranslační modifikace cysteinových residuí. GSNOR, dříve popsána jako S- (hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa,

patří do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III. GSNOR je vysoce specifická pro substrát S-nitrosogluthation. Bylo prokázáno, že nepřímo reguluje celkové množství proteinových S-nitrosothiolů. Elicitiny patří do skupiny apoplastických efektorů sekretovaných např. rodem *Phytophthora* a blíže s ní příbuzným rodem *Pythium* z řádu *Pythiales*<sup>2</sup>.

Cílem této práce bylo studovat možné zapojení GSNOR v obranném mechanismu rostlin na modelovém systému suspenzní kultury buněk tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Byla prokázána úloha reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) v obranné reakci tabákových buněk po aplikaci elicitinu kryptogeinu z *Phytophthora cryptogea* a jeho mutantních forem L41F, V84F a L41F/V84F. Stanovení produkce ROS a RNS bylo provedeno s využitím specifických fluorescenčních sond. Kryptogein a mutant V84F významně zvyšují hladinu ROS, což koreluje se sníženou životností buněk. Naopak po aplikaci mutantních forem L41F a L41F/V84F, kdy nebyla životnost buněk ovlivněna, dochází ke zvýšení produkce RNS. Dále byly studovány změny hladiny transkripce genů zapojených do signálních obranných drah u rostlin. Jako zástupce jednotlivých obranných signálních kaskád byly zvoleny následující geny: *PR1* (*pathogenesis related 1*) pro signální dráhu kyseliny salicylové; *AOS* (*allene oxide synthase*) pro signální dráhu kyseliny jasmonové, *Hel* (*hevein-like*) pro signální dráhu ethylénu, gen pro NADPHoxidasu podílející se na produkci ROS a gen GSNOR regulující hladinu RNS. V případě genu NADPHoxidasu docházelo vždy k upregulaci po aplikaci testovaných elicitinů, zatímco změny na úrovni exprese GSNOR byly pozorovány pouze v případě mutantu L41F.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P501/12/0590.*

#### LITERATURA

1. Foissner I., Wendehenne D., Langebartels Ch., Durner J.: *Plant J.* 23, 817 (2000).
2. Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L., Ricci P.: *Mycol. Res.* 101, 1459 (1997).

#### CHARAKTERIZACE PIP2 VAZEBNÉHO MÍSTA NA INTRACELULÁRNÍ N-KONCOVÉ DOMÉNĚ TRPM1 RECEPTORU

**MICHAELA JIRKŮ<sup>a,b</sup>, KRISTÝNA BOUŠOVÁ<sup>a</sup>, LADISLAV BUMBA<sup>c</sup>, JIŘÍ VONDRÁŠEK<sup>d</sup>, LUCIE BEDNÁROVÁ<sup>d</sup>, JAN TEISINGER<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4; <sup>b</sup>PřF Univerzity Karlovy v Praze, 128 43 Praha 2; <sup>c</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4; <sup>d</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 37 Praha 6 michaela.jirku@fgu.cas.cz

V této studii jsme se zabývali identifikací vazebného místa pro fosfatidylinositol-4,5-bifosfát (PIP2) na TRPM1 receptoru. Melastatinový TRPM1 kanál patří do skupiny TRP (transient receptor potential) kanálů. TRP kanály jsou

neselektivní iontové kanály propusné pro jedno- a dvojmocné kationty a podílející se na sensorických procesech, jako jsou vnímání tepla a chladu, chuti, tlaku, vidění a bolesti. TRPM1 se vyskytuje zejména v kožních buňkách a v bipolárních buňkách sítnice. Mutace genu TRPM1 jsou pak spojeny s vrozeným neměnným typem noční slepoty u lidí a s rostoucí agresivitou melanomů. PIP2 je membránový fosfolipid s mnoha významnými funkcemi v buňce, podílí se na signalizaci, účastní se buněčné adheze, reguluje proteiny.

Naším cílem bylo identifikovat a charakterizovat PIP2 vazebné místo v N-koncové oblasti TRPM1 (TRPM1-NT). Pomocí bioinformačních nástrojů jsme vytipovali A451-N566 PIP2-vázající doménu. K charakterizaci vazby jsme využili metody povrchové plasmonové rezonance, stanovili jsme rovnovážné disociační konstanty. Tyto výsledky naznačují, že se PIP2 váže na TRPM1-NT s vysokou afinitou. Tato oblast proteinu obsahuje několik bazických aminokyselin, které interagují se záporně nabitými fosfolipidy, což jsme potvrdili pomocí cílené mutagenese. Technikou cirkulárního dichroismu jsme popsali změny v sekundární struktuře proteinu po navázání ligandu. Vazbu TRPM1-NT/PIP2 jsme vizualizovali pomocí molekulového modelování - dokování ligandu.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR 301/10/1159, GAČR 207/11/0717 a GAČR - Projekt excelence v oblasti neurověd P304/12/G069.*

#### LITERATURA

1. Zhu M. X.: Pflugers Arch. 451, 105 (2005).
2. Nakamura M., Sanuki R., Yasuma T. R., Onishi A., Nishiguchi K. M., Koike C., Kadowaki M., Kondo M., Miyake Y., Furukawa T.: Mol. Vis. 16, 425 (2010).
3. Holakovska B., Grycova L., Jirku M., Sulc M., Bumba L., Teisinger J.: J. Biol. Chem. 287, 16645 (2012).

#### MOČOVÉ miRNA JAKO POTENCIÁLNÍ BIOMARKERY UROTELIÁLNÍHO KARCINOMU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE

**JAROSLAV JURÁČEK, HANA MLČOCHOVÁ, BARBORA PELTANOVÁ, ONDŘEJ SLABÝ**

*Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 65653 Brno  
juracekjaroslav@gmail.com*

Uroteliální karcinom močového měchýře (UKMM) se řadí mezi nejčastější maligní onemocnění urinárního systému. Běžně je dělen na sval-invadující (muscle-invasive) a povrchový sval-neinvadující (superficiální) karcinom, který zaujímá přibližně 80 % všech případů. Přes relativně vysoký výskyt superficiálních tumorů je uroteliální karcinom močového měchýře asociován s častou progresí v invazivní formu, ke které dochází u více jak 20 % případů. Přestože cystoskopie zůstává hlavní technikou v detekci a sledování pacientů s karcinomem močového měchýře, v případě karcinomu *in situ* nebo příliš malé nádorové léze může být malignita lehce přehlédnuta. Tato skutečnost vedla k vývoji nových technologií a urinárních testů, přesto v současnosti

není k dispozici dostatečně senzitivní biomarker, který by odrazil biologické vlastnosti karcinomu a případně umožnil časnou detekci relapsu, který nastává až u 70 % povrchového karcinomu. Požadavkům na takové biomarkery by mohly vyhovovat močové mikroRNA (miRNA), které vykazují velmi vysokou stabilitu a dobré analytické vlastnosti.

Za použití Affymetrix miRNA mikroarrayes jsme analyzovali expresní profily 1733 miRNA v močovém supernatantu 16 pacientů s UKMM (6 invazivní, 5 high-grade neinvazivní, 5 low-grade neinvazivní), 17 zdravých kontrol, 10 pacientů s RCC a 4 pacientů s infekcí močového traktu. Schopnost vybraných močových miRNA identifikovat UKMM a odlišit jeho jednotlivé formy byla potvrzena během validační fáze na novém nezávislém souboru 80 pacientů za použití metody qRT-PCR.

Globální profilování genové exprese odhalilo sadu 76 miRNA, které byly významně rozdílně exprimovány v moči pacientů s UKMM ( $P < 0,01$ ) v porovnání se zdravými kontrolami, z toho 64 regulováno zvýšeně a 12 sníženě. Zároveň tyto miRNA vykazovaly specifitu i při srovnání s dalšími kontrolními kohortami (RCC, infekce). Kromě toho jsme identifikovali 23 miRNA schopných rozlišit invazivní a povrchovou formu UKMM ( $P < 0,01$ ) a 18 miRNA jejichž exprese umožnila odlišit low-grade a high-grade neinvazivní formu UKMM ( $P < 0,01$ ). Následná validace na větší nezávislé kohortě pacientů vedla k sestavení sady miRNA umožňující s vysokou specifitou a senzitivitou diagnostikovat UKMM z moči.

Naše data ukázala, že močové mikroRNA mohou sloužit jako senzitivní a specifické biomarkery uroteliálního karcinomu močového měchýře a po nezávislé validaci na prospektivně sbíraných vzorcích by jejich analýza mohla vhodně navýšit senzitivitu standardního cytologického vyšetření.

*Tato práce vznikla za podpory IGA MZCR: NT/13860-4/2012.*

#### STRUKTURNÍ STUDIE PROTEINOVÉHO KOMPLEXU 14-3-3/PDC

**MIROSLAVA KACÍŘOVÁ<sup>a,b</sup>, ALAN KÁDEK<sup>c</sup>, PETR MAN<sup>c</sup>, JIŘÍ NOVÁČEK<sup>d</sup>, VERONIKA OBŠILOVÁ<sup>b</sup>, TOMÁŠ OBŠIL<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, PřF UK v Praze, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4; <sup>c</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4; <sup>d</sup>Masarykova univerzita, CEITEC 625 00 Brno  
kacirova@natur.cuni.cz*

Tato studie se zabývá biofyzikální charakterizací proteinového komplexu fosducinu (Pdc) s jeho vazebným partnerem, proteinem 14-3-3. Oba proteiny se nachází v sítnici oka a jsou součástí G-proteinové kaskády přenosu světelného signálu. Protein fosducin negativně reguluje přenos signálu tím, že váže G $\beta\gamma$  podjednotku transducinu a znemožňuje tak její reasociaci s G $\alpha$  podjednotkou. Dojde-li ovšem k fosforylaci Pdc na dvou jeho serinech (S54, S73),

Pdc je vázán proteinem 14-3-3 a tato vazba umožní uvolnění G $\beta\gamma$  podjednotky transducinu a opětovně reasociaci, čímž může dojít k dalšímu přenosu signálu.

Pro přesnější znalost role 14-3-3 při vazbě s Pdc je potřeba tento komplex detailněji strukturně charakterizovat. Z našich studií o fosducinu vyplývá, že jeho polovina je strukturovaná, ale druhá polovina je velmi nestrukturovaná a při vazbě se 14-3-3 dochází ke slabé strukturalizaci. S využitím několika biofyzikálních technik (CD, H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií, SAXS, NMR a tryptofanové zhášení fluorescence) jsme popsali chování Pdc při tvorbě jeho komplexu se 14-3-3. Naše měření naznačují, že Pdc má tzv. fuzzy charakter, který je charakteristický pro vnitřně neuspořádané proteiny.

Zajímala nás také další biologická relevance proteinu 14-3-3 v komplexu. Předpokládáme, že by protein 14-3-3 mohl zpomalovat defosforylaci Pdc. Tato myšlenka se potvrdila v kinetických studiích defosforylace Pdc fosfatasou PP1. K zobrazení fosforylačního stavu Pdc byla využita SDS-PAGE obsahující Phos-Tag.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR P305/11/0708, GA ČR P207/11/0455; GA UK 793913 a výzkumného projektu RVO 67985823 Fyziologického ústavu AV ČR.*

#### LITERATURA

1. Gaudet R., Bohm A., Sigler P. B.: Cell 87, 577 (1996).
2. Nakano K., Chen J., Tarr G. E., Yoshida T., Flynn J. M., Bitensky M. W.: Neurobiology 98, 4693 (2001).
3. Lee B. Y., Thulin C. D., Willardson B. M.: J. Biol. Chem. 279, 54008 (2004).
4. Rezaczkova L., Kacirova M., Sulc M., Herman P., Vecer J., Stepanek M., Obsilova V., Obsil T.: Biophys. J. 103, 1960 (2012).

#### STRUKTURNÍ DYNAMIKA PROTEINU WrbA PHELEDEM HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**ALAN KÁDEK<sup>a,b</sup>, ZDENĚK KUKAČKA<sup>a,b</sup>, MICHAL ROSŮLEK<sup>b</sup>, PETR MAN<sup>a,b</sup>, RUDIGER ETTRICH<sup>c</sup>, PETR NOVÁK<sup>\*a,b</sup>**

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AVČR, 142 20 Praha; <sup>b</sup>PřF UK v Praze, 128 43 Praha; <sup>c</sup>Ústav nanobiologie a strukturní biologie AVČR, 539 45 Nové Hradky  
kadek@biomed.cas.cz

Protein WrbA (z anglického Tryptophan repressor-binding protein A) je vysoce zajímavým enzymem zapojeným do obrany řady organismů před oxidativním stresem. Přestože byla v nedávné době vyřešena jeho statická tetramerní struktura v rozlišení 1,2 Å pomocí rentgenové krystalografie<sup>1</sup>, dynamické chování tohoto proteinu zahrnující rovnováhu mezi monomerním, dimerem a tetramerním zůstává nadále předmětem zkoumání.

Cílem tohoto projektu bylo strukturně-funkční studium enzymu WrbA, zaměřené na objasnění jeho dynamiky v roztoku a pochopení faktorů určujících jeho oligomerní a konformační stav.

Studovaný protein byl exprimován v bakteriálním systému *E. coli* a následně zkoumán pokročilými technikami strukturní hmotnostní spektrometrie. Nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou umožnila šetrně převést nekovalentní tetramerní komplex WrbA z roztoku do plynné fáze při zachování jeho struktury a ukázala dramatický stabilizující vliv kofaktoru FMN na protein v jeho tetramerní formě. Odhalila také pozitivní mezidoménový kooperativní efekt, uplatňující se při vazbě molekul FMN na jednotlivé enzymové podjednotky tetrameru.

Protein byl dále studován pomocí vodík / deuteriové výměny a chemického síťení v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Tyto techniky umožnily detailní popis a strukturní lokalizaci konformačních změn v makromolekule WrbA v závislosti na přítomnosti kofaktoru a na měnících se podmínkách v roztoku. Zkoumány byly zejména teplota roztoku a koncentrace studovaného proteinu, určující dle výsledků analytické ultracentrifugace jeho oligomerní stav ovlivněním dynamické rovnováhy mezi dimerem a tetramerním.

V kombinaci s počítačovým modelováním poskytly využitě komplementární techniky hmotnostní spektrometrie jinak nedostupný nový pohled na reálné chování tohoto enzymu v roztoku a nabídly vysvětlení mechanismu jeho oligomerizace.

*Tato práce vznikla za podpory stipendia od Evropského konsorcia pro strukturní biologii InStruct, grantů UK (GAUK 800413, UNCE 204025/2012), GAČR (P207/10/1934), Czech-US International Research Cooperation (ME09016) a Evropských rozvojových fondů (CZ.2.16/3.1.00/24023).*

#### LITERATURA

1. Kishko I. et al.: Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 69, 9 (2013).

#### NEUROPROTEKTIVNÍ VLASTNOSTI 3 $\alpha$ C-SUBSTITUOVANÉHO DERIVÁTU PREGNANOLONU V ANIMÁLNÍM MODELU ISCHEMIE

**LENKA KLETEČKOVÁ, LUKÁŠ RAMBOUSEK, KATEŘINA VONDRÁKOVÁ, HANA KUBOVÁ, GRYGORIJ TSENOV, LADISLAV VYKLICKÝ Jr., EVA KUDOVÁ, HANA CHODOUNSKÁ, KAREL VALEŠ**

Fyziologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
lenka.kleteckova@fgu.cas.cz

Hypoxicko-ischemický izult je jedna z nejčastějších forem poškození mozku v perinatálním věku spojená s vážnými neurologickými následky a komplexem molekulárních procesů vedoucích k masivnímu výlevu glutamátu, laktátové acidóze a oxidačnímu stresu. Ačkoli důležitost glutamátové excitotoxicity ve zralém mozku je

velmi intenzivně studována, její mechanismus během perinatální periody není úplně objasněn.

Neuroaktivní steroidy jsou látky steroidní povahy syntetizované nebo metabolizované *de novo* v mozku, ovlivňující mnoho fyziologických dějů. Neuroaktivní steroid 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamát (PG), syntetický analog přirozeně se vyskytujícího 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon sulfátu, je negativní modulátor glutamátových NMDA receptorů a současně pozitivní modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů<sup>1</sup>. V této studii jsme použili PG jako látku s možným neuroprotektivním účinkem vedoucím ke zmírnění dopadů hypoxicko-ischemického poškození.

Fokální ischemie byla indukovaná infuzí vasokonstriktivního endothelinu-1 (ET-1; 40 pmol) do pravého dorsálního hippocampu u 12denních mláďat laboratorního potkana kmene Wistar. Stav mozku 12denního mláďete potkana vývojově odpovídá stavu mozku lidského novorozence. PG v dávce 1 nebo 10mg/kg byl následně intraperitoneálně podán 5min od ukončení infuze ET-1. Po aplikaci PG jsme zaznamenali signifikantně redukováné poškození pyramidálních a granulárních buněk v postiženém hippocampu. Dále podání této látky vedlo k protekci parvalbumin pozitivních interneuronů, redukcii aktivity mikroglie a snížené astroglie. Výsledky z mikrodialýzy prokázaly redukováné množství laktátové acidózy a dále také sníženou produkci reaktivních forem dusíku. Naše výsledky potvrzují neuroprotektivní účinek PG v použitém modelu fokální ischemie nezralého mozku.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR P304/12/G069, P304/14/2016, TAČR-TE01020028 a institucionální podpory RVO: 679858523.*

#### LITERATURA

- Petrovic M., Sedlacek M., Horak M., Chodounska H., Vyklicky L.: *J. Neurosci.* 25, 37 (2005).

#### EXTRACELLULAR MATRIX HYDROGEL SCAFFOLDS FOR SPINAL CORD INJURY TREATMENT

**ZUZANA KOČÍ<sup>a,b</sup>, KAREL VÝBORNÝ<sup>a,b</sup>, DMITRY TUKMACHEV<sup>a,b</sup>, KRISTÝNA KÁROVÁ<sup>a,b</sup>, SERHIY FOROSTYAK<sup>a,b</sup>, EVA SYKOVÁ<sup>a,b</sup>, ŠÁRKA KUBINOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Experimental Medicine, AS CR, 142 20 Prague;*

<sup>b</sup>*Department of Neuroscience, 2<sup>nd</sup> Medical Faculty, Charles University, 150 06 Prague*  
zuzana.koci@biomed.cas.cz

Spinal cord injury (SCI) often results in a loss of motor and sensory function as a consequence of the inability of axons to regenerate across the lesion. To bridge the lesion and re-establish damaged connections after SCI, modern biomaterials, hydrogels made from tissue specific extracellular matrix (ECM), have been prepared and evaluated *in vitro* in order to be later implanted *in vivo* into the acute model of SCI. We prepared three types of ECM

extracted from porcine brain (BM); spinal cord (SCM) and urinary bladder (UBM). Mesenchymal stromal cells (MSCs) from different sources (human bone marrow, human adipose tissue, human Wharton jelly) were cultured on the ECM hydrogels and evaluated *in vitro* in terms of cell adhesion, proliferation and migration.

ECM scaffolds were prepared by the decellularization of porcine brain tissue, spinal cord and urinary bladder<sup>1</sup>. After decellularization, collagen and glycosaminoglycans in the scaffolds were evaluated. Cell viability and migration were evaluated using a WST assay and xCELLigence system.

In an *in vivo* study, a hemisection was performed at the Th8 level, and SCM and UBM hydrogels were acutely injected into the spinal cord defect and allowed to gelate *in situ*. The effects were evaluated via histological analysis and real-time qPCR.

The structure of ECM hydrogels was similar to that of the native ECM (Fig.1A). In terms of composition, BM ECM contained the highest amount of sulphated glycosaminoglycans, while UBM ECM contained the highest amount of collagen (Fig. 1B). All types of ECM hydrogels supported the proliferation of MSCs which was comparable with cell proliferation on tissue culture plastic (Fig. 2). All type of ECM hydrogels also promoted MSC migration (Fig. 3).

*In vivo*, SCM and UBM hydrogels integrated into the host tissue and stimulated neovascularization and nervous tissue ingrowth into the lesion. No significant differences were found between SCM and UBM hydrogels with regards to ingrowth of neurofilaments and blood vessels at all observed time points.

ECM hydrogels were biocompatible, promoted cell proliferation in a similar way as TCP and revealed chemotactic properties. Both ECM hydrogels modulated the innate immune response and provided the benefit of a stimulatory substrate for *in vivo* neural tissue regeneration. In conclusion, ECM scaffolds are a promising material for the repair of injured neural tissue.

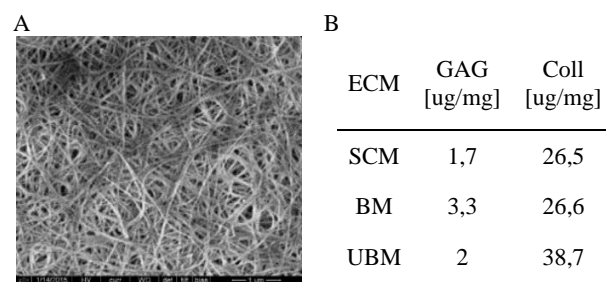


Fig. 1. SEM image of ECM from porcine urinary bladder (A). Content of sulphated glycosaminoglycans and collagen in ECM (B)



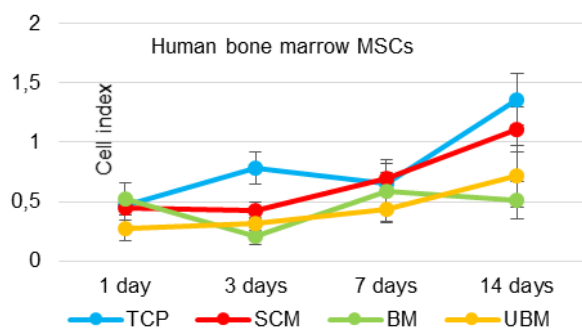


Fig. 2. Proliferation of human bone marrow MSCs on three types of ECM hydrogels and tissue culture plastic (TCP)

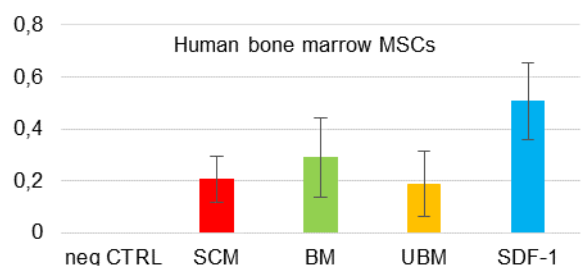


Fig. 3. Comparison of human bone marrow MSC migration towards ECM hydrogels, medium (neg. CTRL) and positive chemoattractant stromal-derived factor 1 (SDF-1)

This project was supported by GAUK 1846214, TG 01010135, LO1309 of the MEYS CR.

#### REFERENCE

1. Medberry C. J., Crapo P. M., Siu B. F., Carruthers C. A., Wolf M. T., Nagarkar S. P., Agrawal V., Jones K. E., Kelly J., Johnson S. A., Velankar S. S., Watkins S. C., Mado M., Badylak S. F.: *Biomaterials* 34, 1033 (2013).

### ENANTIOMERNÍ SEPARACE NOVÝCH SYNTETICKÝCH DROG: MÓDA NEBO NUTNOST?

MICHAL KOHOUT<sup>a</sup>, DENISE WOLRAB<sup>b</sup>, WOLFGANG LINDNER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT v Praze, 166 28 Praha 6,

<sup>b</sup>Katedra analytické chemie, Univerzita Vídeň,

Währinger Strasse 38, A-1090 Vídeň

michal.kohout@vscht.cz

Nelegální psychofarmaka tzv. nové syntetické drogy v posledních letech zaplavují evropský trh<sup>1</sup>. Tyto látky jsou většinou prodávány na internetu a na černém trhu jako „koupací soli“ či „hnojiva pro květiny“. Významnou část nelegálního trhu zaujímají syntetické katinony, analoga přírodního  $\beta$ -ketoamfetaminu, který je přítomen v listech rostliny *Catha edulis*.

Obdobně jako amfetaminy, řadí se katinony mezi sympatomimetika způsobující tachykardii či hypertenzi, avšak zároveň s tím významně ovlivňují psychiku uživatele<sup>2</sup>. Mezi nejrozšířenější zástupce dostupné na černém trhu patří

mefedron a methylon, které jsou od počátku nového tisíciletí spojovány s množstvím náhlých úmrtí uživatelů po celé Evropě<sup>3,4</sup>.

Nové syntetické drogy jsou většinou prodávány jako směsi různých látek, což jednak znesnadňuje policejním a celním úřadům analýzu zabavených látek a zároveň nabízí široké možnosti pro studium nových látek s neznámým potenciálem. Vzhledem k tomu, že různé enantiomery téže látky mohou v chirálním prostředí živého organismu působit zcela rozdílným mechanismem, enantiomerní separace těchto sloučenin a následné zhodnocení biologické aktivity jednotlivých enantiomerů by mohlo poskytnout farmaceuticky zajímavé substance<sup>5</sup>. Cílem prezentované studie je tedy separace enantiomerů nových syntetických drog a charakterizace jejich účinků a účinku jejich enantiomerů na živé organismy.

#### LITERATURA

1. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA): The State of the Drugs Problem in Europe - Annual Report 2011. Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/annual-report/2011>.
2. Prosser J. M., Nelson L. S.: *J. Med. Toxicol.* 8, 33 (2012).
3. Gibbons S., Zloh M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 4135 (2010).
4. Gallegos A., Sedefov R.: Report on the risk assessment of mephedrone in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances (2011).
5. Bergqvist Y., Alkabbani J., Pettersson, C., Huynh N. H.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 620, 217 (1993).

### INTRAMOLEKULÁRNÍ ENYNOVÉ METATEZE

VIOLA KOLAŘÍKOVÁ, JAROSLAV KVÍČALA

VŠCHT Praha, Technická 5, 16628 Praha 6

kolarikv@vscht.cz

Enynová metateze je nově vyvinutá transformace umožňující syntézu 1,3-dienů z poměrně jednoduchých prekurzorů za mírných podmínek. Tyto látky potom mohou sloužit jako prekurzory pro cykloadice, vedoucí až k přírodním produktům a jejich analogům. Přestože jsou enynové metateze ze syntetického hlediska velmi zajímavé, nebyly doposud dostatečně prozkoumány a v této oblasti zůstává mnoho rozporů a nezodpovězených otázek<sup>1,2</sup>.

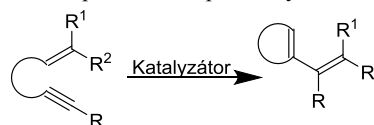


Schéma 1. Intramolekulární enynová metateze

Enyny, dienyny a endiyny mohou potenciálně sloužit jako substráty pro intramolekulární enynové metateze. Abychom mohli testovat jejich reakce, připravili jsme nejprve skupinu modelových dienynů a endiynů. Na těchto

látkách jsme následně testovali jejich schopnost reagovat v rámci enynových metatezí (Schéma 2).

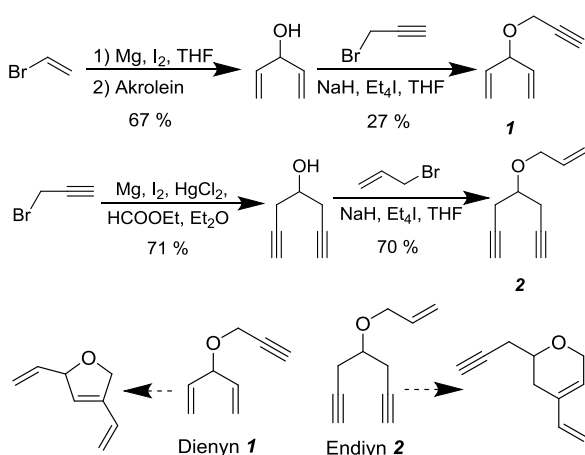


Schéma 2. Syntézy a metateze dienynu 1<sup>3</sup> a endiynu 2

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR č. 207/10/1533.

#### LITERATURA

- Hansen E.C., Lee D.: Acc. Chem. Res. 39, 509 (2006).
- Nicolau K.C., Bulger P.G., Sarlah D.: Angew. Chem. Int. Ed. 44, 4490 (2005).
- Virolleaud M.-A., Piva O.: Eur. J. Org. Chem. 2007, 1606.

#### PLEIOTROPNÁ ÚLOHA FGF2 V STRÓME MLIEČNEJ ŽLAZY

**ZUZANA KOLEDOVÁ<sup>a</sup>, ALEŠ HAMPL<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie, Kamenice 753/5, 625 00 Brno  
koledova@med.muni.cz

Signalizácia prostredníctvom fibroblastových rastových faktorov (FGF) hrá kľúčovú úlohu v regulácii vývinu cicavcov od najskorších embryonálnych štádií až do dospelosti. Okrem iných funkcií, signalizácia FGF sprostredkuje epitelovo-stromálne interakcie, ktoré sú nevyhnutné pre správne formovanie orgánov a homeostázu. V mliečnej žľaze signalizácia FGF reguluje vetvenie epitelu a funkciu epitelových kmeňových buniek. Avšak úloha signalizácie FGF v stróme mliečnej žľazy nebola dosiaľ preštudovaná.

Naše výsledky ukazujú, že signalizácia FGF je funkčná v primárnych fibroblastoch mliečnej žľazy a je sprostredkovaná receptorom FGFR1c. Ošetrovanie fibroblastov faktormi FGF2, FGF7 a FGF10 aktivuje následnú signálnu kaskádu prostredníctvom MAPK a expresiu cieľových génov. Avšak spomedzi týchto faktorov len FGF2 zvyšuje proliferáciu, migráciu a matrix-remodelačnú aktivitu fibroblastov. Naviac, signalizácia FGF2 indukuje dosiaľ nepopísaný invazívny fenotyp fibroblastov. náš unikátny 4D

organotypický model mliečnej žľazy ukazuje, že tento invazívny fenotyp je vyvolaný epitelom, pravdepodobne prostredníctvom epitelom produkovaného amfiredulínu, a predstavuje „vývojovo aktivovanú“ formu fibroblastov, ktorá reguluje procesy vetvenia epitelu mliečnej žľazy.

Naše výsledky odhaľujú nové procesy regulácie vývoja a homeostázy orgánov, ktorých deregulácia môže viesť k vzniku nádorov.

Táto práca bola podporená z projektu „Zaměstnaním nejlepších mladých vědců k rozvoji mezinárodní spolupráce“ (CZ.1.07/2.3.00/30.0037), ktorý je spolufinancovaný Európskym sociálnym fondom a štátnym rozpočtom Českej republiky.

#### STRUKTURNÍ STUDIE ENZYMU KVASNIČNÉ NEUTRÁLNÍ TREHALASY A JEHO KOMPLEXU S PROTEINEM 14-3-3

**MIROSLAVA KOPECKÁ<sup>a,b</sup>, PETR MAN<sup>c</sup>, ZDENĚK KUKAČKA<sup>c</sup>, VERONIKA OBŠILOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4,

<sup>b</sup>2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 150 06 Praha

5, <sup>c</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4

kopekamirka17@gmail.com

Enzym neutrální trehalasa (Nth1, EC 3.2.1.28) prirodzene se vyskytující v kvasinkách rodu *Saccharomyces cerevisiae* hydrolyzuje neredukující disacharid trehalosu, která v mnoha nejrůznějších organismech slouží jako zásobní sacharid a univerzální ochrana vůči stresu. Aktivita Nth1 je zvyšována vazbou proteinu 14-3-3 na fosforylovanou formu enzymu. K regulaci aktivity také přispívá vazba  $Ca^{2+}$  na tzv. EF-hand motiv nacházející se v Ca-vazebné doméně Nth1 (cit.<sup>1</sup>).

Pomocí nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy a analytické ultracentrifugace bylo potvrzeno, že proteiny 14-3-3 tvoří stabilní komplexy s enzymem Nth1. Pro objasnění struktury samotné Nth1 a jejího komplexu s proteiny 14-3-3 byly použity metody cirkulárního dichroismu, H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií, chemické zesíťování<sup>2</sup> a maloúhlový rozptyl RTG paprsků (SAXS)<sup>3</sup>. Souběžně s těmito experimenty je prováděna proteinová krystalografie samotné Nth1 i jejího komplexu s kvasničným proteinem 14-3-3.

Struktura s nízkým rozlišením odhalila, že oblast Nth1 obsahující EF-hand motiv tvoří samostatnou doménu, která interaguje jak s proteinem 14-3-3, tak s katalytickou trehalasovou doménou Nth1. Bylo prokázáno, že integrita EF-hand motivu je klíčová pro aktivaci Nth1 prostřednictvím proteinů 14-3-3 a vazbu  $Ca^{2+}$ , která však není pro aktivaci Nth1 nutná. Získaná data napovídají, že Ca-vazebná doména funguje jako prostředník, skrze kterého protein 14-3-3 moduluje funkci katalytické domény Nth1. Tyto změny pravděpodobně usnadňují přístup substrátu do aktivního centra enzymu<sup>3</sup>.

Předložená studie komplexu proteinu 14-3-3 s plně aktivním enzymem Nth1 poskytuje strukturní pohled

na aktivaci Nth1, který může sloužit k porozumění procesu regulace aktivity Nth1 stejně tak jako k pochopení úlohy proteinů 14-3-3 v regulaci dalších enzymů.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA UK 644313 a GA ČR P207/11/0455.

#### LITERATURA

1. Veisova D., Macakova E., Rezabkova L., Sulc M., Vacha P., Sychrova H., Obsil T., Obsilova V.: *Biochem. J.* **443**, 663 (2012).
2. Macakova E., Kopecka M., Kukacka Z., Veisova D., Novak P., Man P., Obsil T., Obsilova V.: *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**, 4491 (2013).
3. Kopecka M., Kosek D., Kukacka Z., Rezabkova L., Man P., Novak P., Obsil T., Obsilova V.: *J. Biol. Chem.* **289**, 13948 (2014).

### FOSFONÁTOVÉ A FOSFONOTHIOÁTOVÉ OLIGONUKLEOTIDY PŘIPRAVENÉ Z (H)-FOSFINÁTOVÝCH MONOMERŮ

**ONDŘEJ KOSTOV, IVAN ROSENBERG**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6  
kostov@uochb.cas.cz

Částečné nahrazení fosfodiesterových vazeb v oligodeoxynukleotidech fosfonátovým C3'-O-P-C-O-C5' uskupením vedlo k výrazné stimulaci aktivity RNasy H1.2 a v případě 2',5' oligoadenylátů k zachování vlastností agonistů RNasy L3. Účinná a rychlá syntéza látek s P=S uspořádáním je výzvou pro vypracování metod analogických s H-fosfonátovou, fosfotriesterovou a fosforamiditovou metodou.

Nukleosidfosfináty **1** byly připraveny alkyací nukleosidu **2** syntonem **3** (Schéma 1). Monomer **1** byl inkorporován do oligomeru a vzniklé vazby byly po syntéze oxidovány na P=O nebo P=S uspořádání.

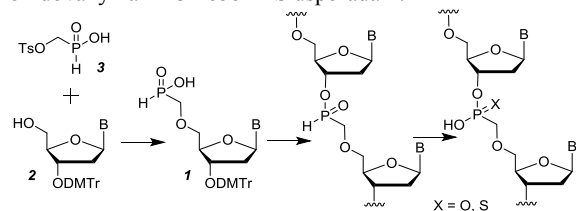


Schéma 1

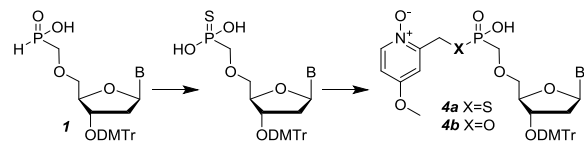


Schéma 2

Pro přípravu fosfonthioátových oligomerů fosfotriesterovou metodou s definovanými P=S a P=O pozicemi jsme vyvinuli monomery typu **4a**, které v kombinaci s již známými typy **4b** (Schéma 2) zaručují

správnou sekvenci fosfonátových a fosfonthioátových internukleotidových vazeb.

Support by the grant 13-26526S (Czech Science Foundation) and project RVO: 61388963, is gratefully acknowledged.

#### LITERATURA

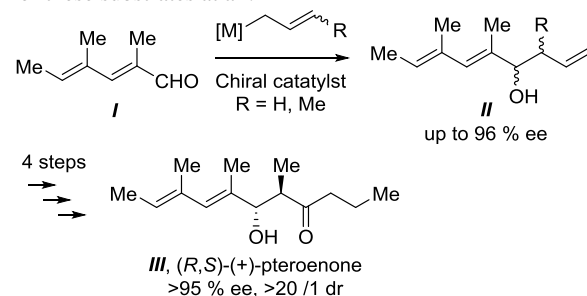
1. Rosenberg I.: In *Frontiers in Nucleosides and Nucleic Acids* (Schinazi R.F. and Liotta, D.C. eds.); IHL Press: Tucker, GA, pp. 519–548, (2004).
2. Šípová H., Špringer T., Rejman D., Šimák O., Petrová M., Novák P., Rosenbergová Š., Páv O., Liboska R., Barvík I., Štěpánek J., Rosenberg I., Homola J.: *Nucl. Acids Res.* **42**, 5378 (2014).
3. Páv O., Panova N., Snášel J., Zborníková E., Rosenberg I.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 181 (2012).
4. Fougère C., Guénin E., Hardouin J., Lecouvey M.: *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6048.

### ENANTIOSELECTIVE ALLYLATION OF $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -UNSATURATED ALDEHYDES: SYNTHESIS OF (R,S)-(+)-PTEROENONE

**PETR KOUKAL, MARTIN KOTORA**

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science  
Charles University in Prague, Hlavova 8, 123 43, Praha 2  
kotora@natur.cuni.cz

Asymmetric allylation (R = H) of aldehydes is a well-established reaction yielding homoallylic alcohols in high yields and enantiomeric excess up to 99 % ee<sup>1</sup>. Unlike various aromatic aldehydes  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes **I** have received considerably less attention. Although the scaffold of alcohol **II** occurs within many natural products, enantioselective crotylation (R = Me) has not been reported for these substrates at all.



Scheme 1. Enantioselective allylations and crotylations of dienal **I** and consecutive synthesis of (R,S)-(+)-pteroenone

A comparative study of enantioselective allylation and crotylation of **I** using different protocols was undertaken. Reactions in presence of chiral catalysts (Lewis acids, Lewis bases<sup>2</sup> or Brønsted acids) or chiral allylation reagents were carried out. Alcohol **II** was isolated in good yields and moderate to very good enantioselectivities up to 96 % ee.

The developed procedure of asymmetric crotylation was applied for a synthesis of (R,S)-(+)-pteroenone **III**,

a defensive metabolite isolated from Arctic pteropod *Clione antarctica*.

This work was supported by grants from Ministry of Education, Youth, and Sports (MSM0021620857) and the Czech Science Foundation (P207/11/0587).

#### REFERENCE

1. Yus M., González-Gómez J. C., Foubelo F.: Chem. Rev. 111, 7774 (2011).
2. Kadlčíková A., Valterová I., Ducháčková L., Roithová J., Kotora M.: Chem. Eur. J. 16, 9442 (2010) and references therein.

#### MITOCHONDRIÁLNÍ PROTEIN TMEM70: KLÍČOVÁ ROLE VE SKLÁDÁNÍ ATP SYNTASY POTVRZENA V MYŠÍM KNOCKOUT MODELU

**JANA KOVALČÍKOVÁ<sup>a</sup>, MAREK VRBACKÝ<sup>a</sup>, HANA NUSKOVÁ<sup>a</sup>, KALLAYANEE CHAWENGSAKSOPHAK<sup>b</sup>, INKEN BECK<sup>b</sup>, RADISLAV SEDLÁČEK<sup>b</sup>, PAVEL HOZÁK<sup>b</sup>, DAVID SEDMERA<sup>a</sup>, JOSEF HOUŠTĚK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fyziologický ústav, AV ČR, v.v.i. 142 20 Praha 4; <sup>b</sup>Ústav molekulární genetiky, AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4  
Jana.Kovalcikova@fgu.cas.cz

TMEM70 je transmembránový protein lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně. Zde se podílí na sestavování eukaryotické ATP syntasy, která je hlavním producentem ATP v buňkách. Mutace v genu *TMEM70* způsobují u pacientů izolovaný defekt ATP syntasy, který často vede k fatální neonatální mitochondriální encefalokardiomyopatii.

Abychom zjistili funkci TMEM70 proteinu, vytvořili jsme *Tmem70* knockout myši pomocí technologie embryonálních kmenových buněk. Zatímco heterozygotní (+/-) myši se vyvíjely normálně, homozygotní knockout (-/-) embrya byla výrazně retardovaná a umírala v průběhu zárodečného vývoje okolo E9.5. Detailnější morfologická analýza -/- embryí ukázala ve srovnání s kontrolními (+/+) opožděný vývoj kardiiovaskulárního systému. Pomocí elektronové mikroskopie jsme rovněž pozorovali narušené mitochondriální krysty. Modrá nativní elektroforéza demonstrovala u -/- embryí izolovaný defekt ATP syntasy: množství plně složeného F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> komplexu bylo sníženo na 20 % hladiny +/+ embryí a došlo k akumulaci F<sub>1</sub> subkomplexu ATP syntasy. Tento výsledek se podobá defektu ATP syntasy u fibroblastů lidských pacientů. Srovnání dospělých +/- a +/+ myši neukázalo žádné signifikantní rozdíly v množství komplexů respiračního řetězce, spotřebě kyslíku, složení ATP syntasy ani hydrolytické aktivitě ATP syntasy.

Naše práce jako první ukazuje u experimentálního zvířecího modelu, že deficit *Tmem70* genu u myši má letální následky, které rekapituluji defekt *TMEM70* genu u lidí.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR P303/11/0970 a 14-36804G a grantu GAUK 726214.

#### ZTRÁTA TUSC3 ZVYŠUJE TUMORIGENICITU OVARIÁLNÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚK *IN VIVO* A INDUKUJE STRES ENDOPLAZMATICKÉHO RETIKULA A EMT

**KATEŘINA KRATOCHVÍLOVÁ<sup>a,d</sup>, PETER HORAK<sup>b</sup>, MILAN EŠNER<sup>a</sup>, KAREL SOUČEK<sup>c,d</sup>, FRANTIŠEK DRÁFI<sup>a</sup>, VERONIKA JURTIKOVÁ<sup>a</sup>, ALEŠ HAMPL<sup>a</sup>, MICHAEL KRAINER<sup>b</sup>, PETR VAŇHARA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav histologie a embryologie, LF MU, 62500 Brno, ČR;

<sup>b</sup>Dep. of Internal Medicine I and Comprehensive Cancer

Center, MUW, 1090 Vídeň, Rakousko; <sup>c</sup>Oddělení cytokinetiky,

BFÚ, AV ČR, 61265 Brno, ČR; <sup>d</sup>Mezinárodní centrum

klinického výzkumu, FNUSA, 65691 Brno, ČR

katerina.krat@gmail.com

Ovariální karcinom je jednou z nejčastějších gynekologických malignit u žen a pátou nejčastější příčinou úmrtí na onkologické onemocnění<sup>1</sup>. Mezi hlavní příčiny vysoké úmrtnosti na nádory ovarií patří nedostatek časných klinických projevů a s tím spojená pozdní diagnóza, rezistence ke konvenčním terapiím a nedostatek spolehlivých prediktivních biomarkerů. Tumor suppressor candidate 3, dále jen TUSC3, byl identifikován jako možný nádorový supresor u ovariálního karcinomu a bylo zjištěno, že jeho epigentické umlčení koreluje s negativní prognózou pacientek a zároveň zvyšuje proliferaci a migraci buněk *in vitro*<sup>2</sup>. TUSC3 se nachází na membráně drsného endoplazmatického retikula (ER) jako součást oligosaccharyltransferasového komplexu, který se významně podílí na finalizaci N-glykosylace nově syntetizovaných proteinů v ER. Přestože je TUSC3 silným prediktorem malignity onemocnění a potenciálním terapeutickým nebo diagnostickým cílem, jeho molekulární role v mechanismu nádorové transformace či biologií ovariálních nádorových buněk není zdaleka objasněna.

V této práci jsme potvrdili roli TUSC3 jako nádorového supresoru *in vivo* pomocí modelu xenografů nádorů v myších a identifikovali jsme možný mechanismus zvyšující maligní potenciál ovariálních nádorových buněk se sníženou expresí TUSC3. Na morfologické i molekulární úrovni jsme prokázali, že snížená hladina TUSC3 přispívá k manifestaci stresu ER a jeho adaptivní odpovědi a podílí se také na indukci tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT), což je proces podílející se na invazivitě nádoru, angiogenezi a rezistenci k chemoterapiím.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR (NT13573-4/2012), Grantové agentury MU (MUNI/M/1050/2013, MUNI/A/1014/2013 a MUNI/A/1558/2014) a projektů FNUSA-ICRC (CZ.1.05/1.1.00/02.0123) a HistoPARK (CZ.1.07/2.3.00/20.0185).

#### LITERATURA

1. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A.: CA Cancer J. Clin. 64, 9 (2014).
2. Pils D., Horak P., Vaňhara P., Anees M., Petz M., Alfanz A., Gugerell A., Wittinger M., Gleiss A., Auner V., Tong D., Zeillinger R., Braicu E-I., Sehouli J., Krainer M.: Cancer 119, 946 (2013).

## STUDIUM S-NITROSOGLUTATHIONREDUKTASY Z ROSTLINNÉHO PATOGENA *Phytophthora infestans*

LUCIE KUBIENOVÁ<sup>a</sup>, DAVID KOPEČNÝ<sup>a,b</sup>, TEREZA TICHÁ<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemie, PŘF, Univerzita Palackého, <sup>b</sup>Oddělení proteinové biochemie a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, 78371 Olomouc [lkubienova@seznam.cz](mailto:lkubienova@seznam.cz)

S-Nitrosogluthathionreduktasa (GSNOR) je klíčovým regulátorem S-nitrosylace ve vývoji rostlin a jejich odpovědi na abiotické a biotické stresové faktory. GSNOR také reguluje detoxifikaci endogenního a exogenního formaldehydu a podobně jako u živočichů se předpokládá role GSNOR v ochraně proti nitrosacímu stresu. Rozdíly v orgánové lokalizaci enzymu poukazují na možnost zapojení GSNOR v obranných mechanismech rostlin v průběhu patogenese a s ní spojené systémové odezvy.

Ačkoliv GSNOR a její příslušné geny byly již charakterizovány u lidí, *Arabidopsis thaliana* nebo rajčete (*Solanum lycopersicum*, SIGSNOR)<sup>1</sup>, v naší studii jsme se zaměřili na studium GSNOR z rostlinného patogena, a to oomycety *Phytophthora infestans* (PiGSNOR). *P. infestans* je původcem chorob plísňě bramboru a rajčete ovlivňující výnos a tržní kvalitu plodů. Získané výsledky poslouží k lepšímu pochopení významu S-nitrosylace a úlohy GSNOR nejen u patogena, ale i u hostitelské rostliny během různých stádií patogenese *Phytophthora*.

Gen pro PiGSNOR (GenBank XM\_002998982, 1160 bp) byl naklonován do pCDFDuet-1 vektoru a exprimován v T7 *E. coli* pro produkci proteinu s histidinovou kotvou. Pro detailní studium reakce a specificity GSNOR byla provedena místně řízená mutagenese PiGSNOR a SIGSNOR<sup>1</sup>. Po úspěšné expresi a purifikaci proteinů jsme se zaměřili na strukturně-funkční studie. Porovnáním proteinových sekvencí PiGSNOR vykazuje 67% shodu s lidskou GSNOR (EMBL M30471) a 63% identitu s SIGSNOR (GenBank GU296438). Získané kinetické parametry i termodynamická studie pomocí isotermální titrační kalorimetrie ukazují NADH jako preferovaný kofaktor. GSNOR vykazuje širokou substrátovou specificitu. Pro WT i její mutanty se však jeví S-nitrosogluthathion jako nejvhodnější substrát, i když s rozdílnou aktivitou a rychlostí reakce. Metodou biotinswitch jsme detekovali S-nitrosylované proteiny buněčného extraktu z *P. infestans* a identifikovali je hmotnostní spektrometrií. Detailní charakterizace PiGSNOR a jejich mutantů poslouží k porozumění mechanismům interakce mezi rostlinnými patogeny a jejich hostiteli.

Podpořeno grantem MŠMT ČR LH11013.

### LITERATURA

1. Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Luhoval L., Barroso J.B., Petřivalský M.: *Biochimie* 95, 889 (2013).

## ÚLOHA MEZIDOMÉNOVÝCH LINKÉRŮ M3-S2 V OTEVÍRÁNÍ KANÁLU NMDA RECEPTORU

MAREK LADISLAV<sup>a</sup>, ALEŠ BALÍK<sup>a</sup>, JAN KRŮŠEK<sup>a</sup>, JIŘÍ ČERNÝ<sup>b</sup>, LADISLAV VYKLICKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha;  
<sup>b</sup>Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4  
[marek.ladislav@fgu.cas.cz](mailto:marek.ladislav@fgu.cas.cz)

Inotropní glutamátové receptory (iGluR) jsou zodpovědné za excitační synaptický přenos v CNS. Farmakologicky a funkčně lze odlišit několik podtypů iGluR – αMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropanový), kainátový, NMDA (N-methyl-D-aspartátový) a δ receptor. Hlavní funkční rozdíly mezi jednotlivými typy iGluR jsou ve způsobu aktivace jejich kanálu. Molekulární podstata procesu otevírání glutamátového iontového kanálu není však doposud zcela objasněna.

Glutamátové receptory jsou heteromery, které mají identickou doménovou organizaci. iGluR jsou lokalizovány na buněčné membráně. Na extracelulární straně se nachází aminoterminální doména, na kterou navazuje ligand vázající doména (LBD), jež je dále spojena s transmembránovými helixy (TMD) tvořícími vlastní iontový kanál. Na intracelulární straně je pak různě dlouhá karboxyterminální doména. LBD a TMD domény jsou propojeny třemi krátkými polypeptidovými řetězci tzv. linkery. Nejběžněji se vyskytující NMDA receptor se skládá ze dvou obligatorních glycin vázajících (GluN1) a dvou glutamát vázajících podjednotek (GluN2A-D).

Základní představa mechanismu otevírání iontového kanálu předpokládá vazbu ligandu do jeho vazebného místa v LBD, po které následuje konformační změna LBD bránící disociaci agonisty. Tato konformační změna se dále šíří směrem k transmembránovým helixům, kde vyvolá vlastní otevření kanálu. Současné poznatky ukazují na regulační úlohu linkerů při převodu konformační energie z LBD na iontový kanál.

Z tohoto důvodu studujeme vliv centrálního linkeru M3-S2 na proces otevírání kanálu. Pomocí změn v aminokyselinovém složení linkeru jsme prozatím našli specifickou oblast na podjednotce NR1, která pokud je odstraněna, navozuje v nepřítomnosti agonisty otevřený stav receptoru a napodobuje tak otevření kanálu po navázání agonisty. Podjednotka NR2 podobnou funkční změnu nevykazuje. Z výsledků vyplývá, že specifické strukturní vlastnosti linkerů NR1 mají zásadní vliv na otevírání kanálu NMDA receptoru. Domníváme se, že u linkeru podjednotky NR1 se jedná o princip mechanického propojení vazebného místa a vrátek iontového kanálu a že pravděpodobně specifické zkrácení řetězce linkeru napodobuje konformační změnu vyvolanou uzavřením obsazeného vazebného místa. Regulační funkce linkeru podjednotky NR2 je zatím nejasná a nejspíše souvisí s odlišnou geometrií obou linkerů, jak ji naznačuje i molekulární model.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P304/12/G069.

## ÚLOHA ABC TRANSPORTÉRŮ ASOCIOVANÝCH S MNOHOČETNOU LÉKOVOU REZISTENCÍ U KMENOVÝCH BUNĚK

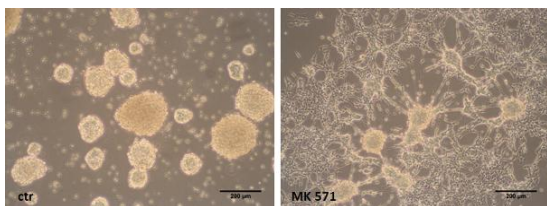
**MARTINA LÁNOVÁ, JOSEF VEČEŘA, JIŘÍ PACHERNÍK**

Ústav experimentální biologie, PřF, Masarykova univerzita  
Kamenice 753/5, 625 00 Brno  
323514@mail.muni.cz

ABC transportéry (ABC-t) jsou aktivní transmembránové pumpy vyskytující se ve většině tkání napříč celou živočišnou říší. Transportéry ABC B1, ABC C1 a ABC G2 jsou spjaty s mnohočetnou lékovou rezistencí díky jejich schopnosti chránit rakovinné buňky před protinádorovými léčivými<sup>1</sup>. Tyto transportéry jsou rovněž vysoce exprimovány u kmenových buněk a kromě chemoterapeutik mají velmi široké spektrum fyziologických substrátů<sup>2</sup>.

V průběhu diferenciaci dostávají kmenové buňky mnoho endogenních i exogenních podnětů. ABC-t mohou ovlivňovat dostupnost a koncentraci těchto signálů a i celkové složení blízkého okolí kmenové buňky a tím pravděpodobně modulovat její životní fáze.

Abychom tuto hypotézu ověřili, sledujeme efekt modulace aktivity ABC-t u myších embryonálních (ES) a neurálních (NS) kmenových buněk získaných z mozků různě starých embryí nebo vzniklých řízenou diferenciací z ES buněk. Nově jsme ukázali významně zvýšenou expresi ABC C1 u populace bohatých na NS buňky. Zaujalo nás, že inhibice transportní funkce ABC C1 (inhibitor MK 571, 3  $\mu$ M, 48 h) u neurosfér vede k poklesu fenotypu typického pro kmenovou buňku a indukuje diferenciaci v neurálním směru (obr. 1.). Stejně tak působí panspecifický inhibitor Verapamil (3  $\mu$ M, 48 h), ale po působení inhibitoru ABC G2 (Fumitremorgin C, 3  $\mu$ M, 48 h) tyto změny nepozorujeme. Neurální diferenciaci také potvrzují výsledky z qRT-PCR a imunocytochemických analýz. V současné době se snažíme tato pozorování potvrdit s využitím siRNA proti ABC C1 a také tyto výsledky korelovat s expresí ABC C1 na neurálních buňkách v CNS.



Obr. 1. Neurální diferenciaci navozená inhibicí ABC C1

### LITERATURA

- Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E.: *Nat. Rev. Cancer* 2, 48 (2002).
- Bunting K. D.: *Stem Cells* 20, 11 (2002).

## VLIV NANOČÁSTIC NA RHEOLOGICKÉ CHOVÁNÍ ROZTOKŮ POLYSTYRENU PŘI OSCILAČNÍCH SMYKOVÝCH TESTECH S VELKOU AMPLITUDOU (LAOS)

**PETR LEPCIO, JOSEF JANČÁŘ**

Středoevropský technologický institut - CEITEC, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 612 00 Brno  
petr.lepcio@ceitec.vutbr.cz

Polymerní nanokompozity nabízejí ve srovnání s konvenčními kompozity dosažení lepších užitečných vlastností při velmi nízkých objemových podílech plniva díky zvýšenému vlivu specifických interakcí mezi částicemi a řetězci v důsledku velkého specifického povrchu nanoplniva<sup>1</sup>. Ačkoliv se tyto materiály uplatňují ve stále se rozšiřující škále aplikací, fundamentální vztahy mezi procesními vlastnostmi, vnitřní strukturou a makroskopickými vlastnostmi zatím nebyly uspokojivě popsány. Podle simulací existují čtyři základní druhy uspořádání nanočástic v polymerní matici, přičemž klíčovými parametry určujícími potenciálové pozadí s přímým vlivem na výsledný disperzní stav jsou povrchová síla mezi polymerem a částicí v kontaktu a prostorový dosah přitažlivosti částic<sup>2</sup>.

Polymerní nanokompozity na bázi polyhedrálních oligomerních silsesquioxanů (POSS) představují vhodný modelový systém pro výzkum základních vztahů spojující anorganické oxokřemičité jádro s organickými funkčními skupinami na povrchu, neboť POSS jsou chemické sloučeniny s definovanou strukturou, změna jejich funkčních skupin umožňuje přizpůsobovat sílu specifické interakce a navíc se obvykle jedná o netěkavé a málo toxické látky bez zápachu. Na suspenzích systémů PS/oktafenyl-POSS (0,1; 1,0 a 10 hm.%) a PS/oktamethyl-POSS (1,0 hm.%) v toluenu byla zkoumána komplexní rheologie v oscilačním smyku s velkou amplitudou (LAOS), přičemž v rozmezí deformace 0,01-5 000 % byly nalezeny tři oblasti s různým vlivem POSS na viskoelastické chování. Předpokládáme, že nízké koncentrace atraktivních OP-POSS dávají v oblasti středně velké amplitudy deformace vzniknout tuhým strukturám, zatímco vyšší koncentrace OP-POSS a méně afinní OM-POSS zůstávají spíše nezúčastněné, působící hydrodynamickými silami jako defekty na strukturu PS. Závěry byly podpořeny termomechanickými výsledky z pevné fáze.

Tato práce vznikla za podpory projektu Evropské komise CEITEC číslo CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

### LITERATURA

- Jančář J., Douglas J. F., Starr F. W., Kumar S. K., Cassagnau P., Lesser A. J., Sternstein S. S., Buehler M. J.: *Polymer* 51, 15 (2010).
- Hooper J. B., Schweizer K. S.: *Macromolecules* 39, 15 (2006).

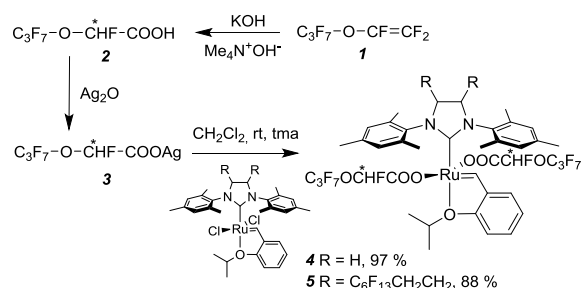
## RUTHENIOVÉ KATALYZÁTORY METATEZE ALKENŮ MODIFIKOVANÉ POLYFLUOROXAALKANOÁTY

PAVLÍNA LIPOVSKÁ, JAN HOŠEK, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ, JAROSLAV KVÍČALA

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6  
lipovskp@vscht.cz

Metateze alkenů, moderní metoda získávání dvojně vazby na přesně definovaném místě v molekule, se často využívá v gumárenském či farmaceutickém průmyslu. Nevýhodou běžně používaných rutheniových katalyzátorů je jejich komplikovaná separace z reakční směsi. Zavedením polyfluor/perfluoralkylových nebo polyfluor/perfluoroxaalkylových řetězců do molekuly Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru lze s výhodou využít separačních technik fluorové chemie (ve smyslu fluorous chemistry)<sup>1</sup>.

Ve své práci jsem se zabývala modifikací komerčního Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru 2. generace a také jeho bis(polyfluoralkylované) varianty připravené v naší laboratoři<sup>2</sup> a získala jsem dva nové rutheniové komplexy 4,5, které nesou racemické polyfluoroxaalkanoátové ligandy.



Dále jsem se zabývala rezolucí racemické polyfluoroxakarbonylové kyseliny 2, prekursoru pro syntézu chirálních analogů připravených komplexů, které by bylo možno využít pro enantioselektivní metateze alkenů. Reakcí kyseliny 2 s (-)-mentholem jsem připravila diastereomerní estery, které jsem separovala sloupcovou chromatografií.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR (reg. č. 207/10/1533).

### LITERATURA

- Babuněk M., Šimůnek O., Hošek J., Rybáčková M., Cvačka J., Březinová A., Kvíčala J.: *J. Fluorine Chem.* 161, 66 (2014).
- Hošek J.: nepublikované výsledky

### OPTIMALIZACE ROVNOVÁHY MEZI AKTIVITOU A STABILITOU ENZYMŮ INŽENÝRSTVÍM JEJICH PŘÍSTUPOVÝCH TUNELŮ

VERONIKA LIŠKOVÁ<sup>a,b</sup>, DAVID BEDNÁŘ<sup>a,b</sup>, TATYANA PRUDNIKOVA<sup>c,d</sup>, PAVLÍNA ŘEZÁČOVÁ<sup>e,f</sup>, TÁŇA KOUDELÁKOVÁ<sup>a</sup>, EVA ŠEBESTOVÁ<sup>a</sup>, IVANA

## KUTÁ SMATANOVÁ<sup>a,d</sup>, JAN BREZOVSKÝ<sup>a</sup>, RADKA CHALOUPKOVÁ<sup>\*a</sup>, JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>Loschmidtovy laboratoře, ÚEB a RECETOX, Masarykova univerzita, 625 00 Brno; <sup>b</sup>FNUSA-ICRC, 656 91 Brno; <sup>c</sup>PrF, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 370 05 České Budějovice; <sup>d</sup>Ústav nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AV ČR, 373 33 Nové Hradky; <sup>e</sup>ÚMG AV ČR, 142 20 Praha; <sup>f</sup>ÚOCHB AV ČR, 166 10 Praha  
verca.liskova@centrum.cz

Enzymy jsou přírodní biokatalyzátory s velkým potenciálem pro biotechnologické aplikace. Většina přírodních enzymů však není schopna snášet náročné reakční podmínky, jako je vysoká teplota, extrémní pH nebo přítomnost organických rozpouštědel, které jsou často v průmyslových aplikacích vyžadovány. Stabilizace enzymů vůči extrémním podmínkám spolu se současným zachováním jejich aktivity tak v posledních desetiletích reprezentuje jeden z důležitých cílů proteinového inženýrství, zejména kvůli často pozorovanému kompromisu mezi aktivitou a stabilitou enzymů. V této práci byla modifikována dříve zkonstruovaná varianta halogenalkandehalogenasy DhaA s vysokou teplotní stabilitou a rezistencí vůči organickým solventům<sup>1</sup>, ale nízkou aktivitou, s cílem vylepšit aktivitu enzymu s udržení jeho vysoké stability. Stabilizace enzymu bylo dosaženo vnesením 4 objemných a hydrofobních aminokyselin do vstupního tunelu, spojujícího zanořené aktivní místo enzymu s okolním prostředím. Modifikací došlo k posílení intra-molekulárních hydrofobních interakcí v ústí vstupního tunelu, které zabráňovaly vstupu denaturujících molekul organického rozpouštědla dovnitř enzymu a současně způsobily pokles enzymové aktivity. Saturační mutagenézí 2 ze 4 původně mutovaných aminokyselin ve vstupním tunelu DhaA došlo k identifikaci nové jednobodové varianty (F176G), vykazující 32x vyšší aktivitu v pufru a 10x vyšší aktivitu v přítomnosti DMSO, v porovnání s původní variantou, při zachování vysoké stability<sup>2</sup>. Strukturní analýza a počítačové simulace odhalily, že nově vnesená mutace F176G rozšířila ústí vstupního tunelu a současně zvýšila flexibilitu sekundárních elementů tvořících stěny přístupového tunelu, čímž došlo k nárůstu enzymové aktivity. Zbývající tři mutace ve vstupním tunelu udržují původní stabilitu enzymu. Závěrem lze konstatovat, že křehké rovnováhy mezi stabilitou a aktivitou enzymu lze dosáhnout zdokonalováním velikosti vstupu a dynamiky transportních tunelů spojících zanořené aktivní místa enzymu s okolním prostředím.

### LITERATURA

- Koudelakova T., Chaloupkova R., Brezovsky J., Prokop Z., Sebestova E., Hessler M., Khabiri M., Plevaka M., Kulik D., Kuta Smatanova I., Rezacova P., Ettrich R., Bornscheuer U., Damborsky J.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 1959 (2013).
- Liskova V., Bednar D., Prudnikova T., Rezacova P., Koudelakova T., Sebestova E., Kuta Smatanova I., Brezovsky J., Chaloupkova R., Damborsky J.: *ChemCatChem*. DOI: 10.1002/cctc.201402792 (2015).

## INTERAKCE STEVIOLU SE ZVOLENÝMI EFLUXNÍMI TRANSPORTÉRY A JEJICH VLIV NA TRANSPORT TRIMETHOPRIMU

JANA MANDÍKOVÁ, MARIE VOLKOVÁ, LUCIE NAVRÁTILOVÁ, PETR PÁVEK, FRANTIŠEK TREJTNAR

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie, 500 05 Hradec Králové  
mandj3aa@faf.cuni.cz

Přírodní sladidlo steviosid patří k nejvíce zastoupeným diterpenoidním glykosidům v rostlině *Stevia Rebaudiana* Bertoli. Steviosid je přeměňován v gastrointestinálním traktu na steviol, který pak přechází přes membránu intestinálních buněk<sup>1</sup>. Cílem této studie bylo zkoumat interakce steviolu (schéma 1) s efluxními transportéry BCRP (Breast cancer resistance protein) a P-gp (P glykoprotein), které jsou exprimovány v lidském gastrointestinálním traktu. Dalším cílem bylo studovat potenciální interakce steviolu s trimethoprimem.

Studie byly provedeny na MDCK II buňkách stabilně exprimujících zkoumané transportéry. V kompetitivních inhibičních studiích na MDCK II buňkách stabilně exprimujících BCRP nebo P-gp byl použit standardní substrát Hoechst 33342. Na stejných buněčných modelech byly následně provedeny testy cytotoxicity, ve kterých byl studován i transport steviolu přes testované transportéry a posuzována možná interakce steviolu s trimethoprimem.

V kompetitivních inhibičních studiích interagoval steviol s P-gp i BCRP a inhiboval eflux substrátu Hoechst 33342 z transfekovaných buněk. Při testech cytotoxicity měl steviol podobný toxický vliv na buňky transfekované P-gp i na buňky kontrolní. Signifikantně nižší cytotoxický vliv steviolu byl však pozorován v buňkách transfekovaných transportérem BCRP. Steviol zvyšoval cytotoxicitu trimethoprimu v buňkách transfekovaných P-gp.

Tato pilotní studie naznačuje, že steviol může působit jako inhibitor P-gp a inhibitor/substrát BCRP. V hladinách, které se mohou fyziologicky vyskytnout ve střevě po perorálním podání, může být steviol schopen inhibovat efluxní transportér P-gp a zvýšit tak absorpci trimethoprimu ve střevě.

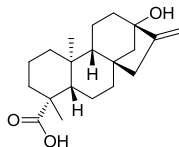


Schéma 1. Struktura steviolu

Tato práce vznikla za podpory Univerzity Karlovy v Praze (projekt SVV 260 064) a projektu GAČR č. 303/12/G163.

### LITERATURA

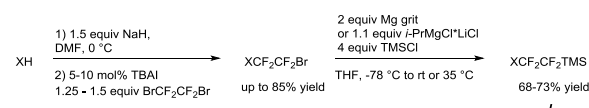
- Chatsudthipong V., Muanprasat C.: *Pharmacol. Ther.* 121, 41 (2009).

## DEVELOPMENT AND USE OF NEW HYPERVALENT IODINE-CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>X REAGENTS

VÁCLAV MATOUŠEK<sup>a</sup>, JIŘÍ VÁCLAVÍK<sup>b</sup>, PETER HÁJEK, EWA PIETRASIĄK<sup>c</sup>, JULIE CHARPENTIER<sup>c</sup>, ALENA BUDÍNSKÁ<sup>b</sup>, ANTONIO TOGNI<sup>c</sup>, PETR BEIER<sup>c</sup>

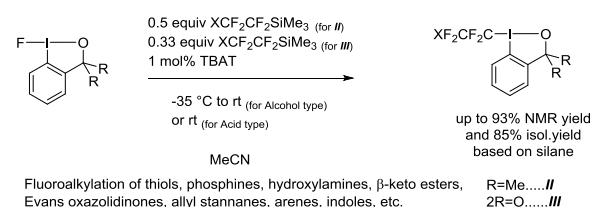
<sup>a</sup>CF Plus Chemicals, s.r.o., 625 00 Brno-Bohunice; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AVČR, 166 10 Praha; <sup>c</sup>ETH Zurich, Vladimir-Prelog-Weg 2, CH-8093 Zurich, Switzerland  
vamatousek@gmail.com

We would like to report the synthesis and use of new cyclic hypervalent iodine-CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>X reagents. These reagents present an extension of the known CF<sub>3</sub> analogues, also termed as Togni reagents<sup>1</sup>. The synthesis of these reagents starts from various aromatic or heteroaromatic nucleophiles (thiophenols, phenols, azoles) which are transformed into fluoroalkyl silanes **I**.



Scheme 1: Synthesis of fluoroalkyl bromides and silanes

Fluoride-mediated activation of **I** in the presence of excess hypervalent iodine-fluorides leads to the formal Umpolung of the fluoroalkyl moiety and affords stable, often crystalline hypervalent iodine-fluoroalkyl reagents of the formula **II** and **III**. A range of X substituents providing handles for further functionalisation (bromoarene, ester moiety) or units (fluorescent pyrene unit) could be incorporated.



Scheme 2: Synthesis of hypervalent iodine-CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>X reagents

These reagents behave as formally electrophilic donors of the CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>X moiety towards a variety of nucleophiles. With these reagents, 9 different nucleophile classes were fluoroalkylated in up to 91% isolated yields. The reagents showed an especially high reactivity towards thiols demonstrating the potential to act as unique bioconjugation reagents for site-specific thiol tagging. General outlook of the use of CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>X moieties in life- and material sciences will be discussed.

### REFERENCE

- Eisenberger P., Gischig S., Togni A.: *Chem. Eur. J.* 12, 2579 (2006).



**KDYŽ NA MÍSTĚ ZÁLEŽÍ: VZTAH INTEGRAČNÍCH MÍST A STABILNÍ EXPRESE RETROVIRŮ****DALIBOR MIKLÍK, FILIP ŠENIGL, JIŘÍ HEJNAR\***

Ústav molekulární genetiky AV ČR, Oddělení virové a buněčné genetiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
miklikd@img.cas.cz, hejnar@img.cas.cz

Integrace retroviróvé DNA je klíčovým krokem v produktivní infekci retrovirů. Integrovaný virus – provirus – je schopen ustanovit stabilní expresi svých genů a zajistit tak stálou produkci virového potomstva. Těto vlastnosti retrovirů se využívá zejména při vývoji vektorů pro přenos genů s požadavkem pro dlouhodobě stabilní genovou expresi. Retroviry, a od nich odvozené vektory, však často podléhají epigenetickému umlčování transkripce, což znesnadňuje dosažení stabilní exprese přenášených genů.

V Laboratoři virové a buněčné genetiky se zabýváme identifikací a popisem lokusů lidského genomu podporujících stabilní expresi retrovirů. Pro tyto účely využíváme retroviróvé vektor odvozený od ptačího retroviru (ASLV). Integrace ASLV se blíží náhodnému výběru genomických lokusů<sup>1</sup> a jeho exprese je v savčích buňkách velmi účinně umlčována<sup>2</sup>. V naší laboratoři byl také zkonstruován retroviróvé vektor odvozený od ASLV, který je modifikován insercí části CpG ostrova do oblasti dlouhých terminálních repetice (LTR)<sup>3</sup>.

Při infekci lidských buněk vykazuje modifikovaný vektor (AG-2IE) oproti nemonifikovanému vektoru (AG) desetinásobně zvýšenou frekvenci výskytu expresně dlouhodobě stabilních provirů. Analýza integračních míst ukazuje, že se expresně stabilní proviry vektoru AG vyskytují převážně v blízkosti aktivních startů transkripčních jednotek s výskytem histonových modifikací H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac a H3K27ac, charakteristických právě pro aktivní transkripční starty či enhancery. Stabilně exprimované proviry vektoru AG-2IE se nacházejí v blízkosti aktivních transkripčních startů s nižší frekvencí než proviry vektoru AG, zatímco se častěji nacházejí v distálních částech transkripčních jednotek. Vektor AG-2IE je tedy uvolněn ze závislosti na charakteristikách místa integrace typické pro stabilně exprimované proviry vektoru AG.

Naše výsledky poukazují na genomické a epigenomické charakteristiky lokusů permisivních pro dlouhodobě stabilní expresi retrovirů. V těchto oblastech se mohou vyskytovat i proviry jiných retroviróvních vektorů selektovaných pro stabilní expresi při aplikacích pro transgenezi či genovou terapii.

*Tato práce vznikla za podpory grantu 13-37600S GAČR.*

**LITERATURA**

- Mitchell R. S., Beitzel B. F., Schroder A. R. W. Shinn P., Chen H., Berry C. C., Ecker J. R., Bushman F. D.: *PLoS Biol.* 2, 8 (2004).
- Šenigl F., Auxt M., Hejnar J.: *Nucl. Acids Res.* 40, 12 (2012).
- Šenigl F., Plachý J., Hejnar J.: *J. Virol.* 82, 16 (2008).

**BIOSYNTETICKÁ PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC ZLATA A STUDIUM JEJICH KATALYTICKÉ AKTIVITY PŘI OXIDACI CO****MARTA NATŠINOVÁ<sup>a</sup>, GABRIELA KRATOŠOVÁ<sup>a</sup>, LUCIE OBALOVÁ<sup>b</sup>, ŽANETA CHROMČÁKOVÁ<sup>b</sup>, ADAM SCHRÖFEL<sup>c</sup>, IVO VÁVRA<sup>d</sup>**

<sup>a</sup>Centrum nanotechnologií, <sup>b</sup>Institut environmentálních technologií, VŠB-TUO, 708 33 Ostrava-Poruba, <sup>c</sup>Ústav buněčné biologie a patologie I. LF UK, 121 08 Praha 2, <sup>d</sup>Elektrotechnický ústav SAV, 841 04 Bratislava  
natsinova.marta@seznam.cz

Zlato v „bulk“ podobě je katalyticky neúčinné, avšak v nanorozměrech nabývá schopnost katalyzovat řadu reakcí. Mezi nejčastější způsoby přípravy katalyzátorů na bázi zlata patří impregnace, koprecipitace a depozičně-precipitační proces<sup>1</sup>. Nicméně obdobný materiál lze připravit pomocí biosyntézy, jakožto nenáročnou a ekologicky šetrnou metodu.

Při biosyntéze zachytí mikroorganismus iont kovu z roztoku a zredukují jej do elementární podoby. Pro experiment byl vybrán druh hnědých řas *Diademsis gallica* (DG). Napěstovaná biomasa byla smíchána s prekurzorem zlata (HAuCl<sub>4</sub>) v poměru 1:1 a inkubována po dobu 48 h při teplotě 5 °C. Rozsivky DG obsahují křemičité schránky, výsledným materiálem po vysušení je tudíž kompozit tvořený amorfním SiO<sub>2</sub> a kotvenými nanočásticemi zlata. Výhodou této metody je, že redukce, stabilizace a imobilizace nanočástic je provedena v jednom kroku. Nanočástice jsou obaleny buněčnými zbytky, které je za normálních podmínek dobře stabilizují.

Před samotnou katalýzou byl vzorek kalcinován (4 h, 400 °C), po tomto kroku dosahuje velikost připravených nanočástic 28 nm. Katalytická aktivita při oxidaci CO byla testována v trubkovém reaktoru s integrovaným ložem katalyzátoru za definovaných podmínek (teplota 30–270 °C, atm. tlak, množství vzorku 0,1 g, celkový průtok 100 ml/min, vstupní směs 2500 ppm CO + 2 mol% O<sub>2</sub> v He). Koncentrace CO a CO<sub>2</sub> byla analyzována pomocí plynového chromatografu s tepelně vodivostním detektorem.

S připraveným materiálem bylo dosaženo 62% konverze CO při 270 °C. Katalytickou aktivitu je možné dále zvýšit modifikací oxidem železa, která již byla na podobném vzorku bionanokompozitu úspěšně testována<sup>2</sup>.

*Tato práce vznikla za podpory grantu SP2015/65 a MŠMT NPU I LO1208 TEWEP.*

**LITERATURA**

- Hutchings G. J.: *Catal. Today* 100, 1 (2005).
- Kratošová G., Vávra I., Horská K., Životský O., Němcová Y., Bohunická M., Slabotinský J., Rosenbergová K., Kadilák A., Schröfel A.: v knize: *Green biosynthesis of nanoparticles: Mechanisms and application*, kap. 5, s. 61-78. CABI Publishing, UK 2014.

## MUTAČNÍ A FUNKČNÍ ANALÝZA GENU *ATM* U PACIENTŮ S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ

**VERONIKA NAVRKALOVÁ, JANA ZEMANOVÁ, LUDMILA ŠEBEJOVÁ, JANA KMÍNKOVÁ, ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ, MARTIN TRBUŠEK**

*CEITEC (Central European Institute of Technology) MU a IHOK FN Brno, Černopolní 9, 61300 Brno  
veronika.navrkalova@ceitec.muni.cz*

Defekty genu *ATM* představují významný prognostický faktor u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Vzhledem ke klíčové roli proteinu *ATM* v odpovědi na poškození DNA mohou mít i důležitý prediktivní význam. Vyčlenění pacientů s inaktivní *ATM* je však komplikované: (a) samotná heterozygotní delece 11q (11q-) nenarušuje funkci proteinu; (b) inaktivace je způsobena bíalelickým defektem (tj. 11q-/mutace nebo dvě mutace); (c) mutační analýza je složitá kvůli extrémní velikosti genu a nejasnému dopadu některých identifikovaných záměn. Cílem práce bylo zavést efektivní detekci *ATM* mutací včetně určení jejich funkčního dopadu.

Analýza genu *ATM* byla provedena u převážně vysoce rizikových CLL pacientů za použití následujících metod: (a) resekvenční čip detekující bodové mutace; (b) western blot pro stanovení hladiny proteinu *ATM*; (c) nově navržený funkční test založený na sledování indukce exprese genu *p21* (Q-RT-PCR) po paralelním ošetření CLL buněk fludarabinem a doxorubicinem; v případě inaktivace *ATM* je indukce *p21* narušená po doxorubicinu a zachovaná po fludarabinu; (d) přímé sekvenování pro potvrzení detekovaných záměn a pro dohledání mutací predikovaných funkčním testem.

Mutace v genu *ATM* byly detekovány u 16 % (22/140) pacientů, přičemž jejich frekvence byla nejvyšší u skupiny pacientů s 11q- (34 %). Všechny mutované vzorky vykazovaly dysfunkci *ATM* prokázanou funkčním testem a/nebo nulovou hladinou proteinu. Tato ztráta funkce *ATM* byla evidentní také skrze defektní aktivaci p53 dráhy po expozici buněk ionizujícím záření. Buňky nesoucí mutaci *ATM* byly jasně rezistentní na doxorubicin, ale nikoli na fludarabin. Pacienti s mutací *ATM* vykazovali téměř identický čas do první terapie jako pacienti se samotnou 11q-.

Pro efektivní identifikaci *ATM* mutací je nejvýhodnější použít několik vzájemně se doplňujících metod a je rozhodně vhodné využít některou z preskriningových metod (zde funkční test) a danou mutaci poté dohledat přímým sekvenováním nebo sekvenováním nové generace (platforma MiSeq, Illumina). Inovativní funkční test je vhodný pro vyhledávání dobře vyselektovaných *ATM* mutací, přičemž vykazuje vysokou senzitivitu (80 %) i specifitu (97 %).

Závěrem lze říci, že mutace genu *ATM* vyskytující se samostatně nebo v kombinaci s 11q- vedou k prokazatelné dysfunkci proteinu *ATM* u pacientů s CLL, zatímco samotná delece 11q neovlivňuje funkci *ATM* směrem k aktivaci p53 dráhy. Výsledky byly publikovány v roce 2013 v časopisech *Haematologica* a *Leukemia and Lymphoma*.

*Tato práce vznikla za podpory grantu CZ.1.07/2.3.00/30.0009.*

## ÚLOHA NUKLEOSIDOVÝCH TRANSPORTÉRŮ V TRANSPLACENTÁRNÍM PŘESTUPU ABAKAVIRU

**ZUZANA NEUMANOVÁ, LUKÁŠ ČERVENÝ, MARTINA ČEČKOVÁ, LUCIE JIRÁSKOVÁ, FRANTIŠEK ŠTAUD**

*Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 500 05 Hradec Králové  
neumz6aa@faf.cuni.cz*

Nukleosidový analog abakavir je v současnosti indikován k léčbě HIV-pozitivních matek a prevenci přenosu viru HIV z matky na plod. Je známo, že abakavir dosahuje terapeutických koncentrací ve fetální cirkulaci, nicméně faktory ovlivňující přestup/kinetiku tohoto léčiva přes placentu doposud nebyly uspokojivě popsány.

Cílem této práce bylo zjistit, zda je transplacentární přestup abakaviru ovlivněn transportéry pro endogenní nukleosidy. Mezi takové transportéry patří i) obousměrné ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENTs), které zprostředkovávají facilitovanou difuzi svých substrátů a jsou selektivně inhibovatelné NBMPR a ii) influxní na koncentračním gradientu sodíku závislé koncentrační nukleosidové transportéry (CNTs). Pro objasnění cíle naší studie jsme použili akumulační studie na lidské placentární buněčné linii BeWo exprimující ENT1 a ENT2 a CNT2 a CNT3, metodu duálně perfundované potkaní placenty a experimenty s tkáňovými fragmenty lidské placenty.

Akumulace abakaviru v BeWo buňkách byla významně snížena v přítomnosti NBMPR (100 nM), kdy dochází k selektivní inhibici ENT1. Snížená akumulace abakaviru byla rovněž pozorována v nepřítomnosti sodíku a navíc byl pozorován aditivní efekt k účinku NBMPR (100 nM). Tyto výsledky poukazují na roli ENT1 a dále CNT2 a/nebo CNT3 v akumulaci abakaviru. Pro zjištění aktivity ENTs a CNTs na orgánové úrovni jsme dále použili metodu duálně perfundované potkaní placenty. Transplacentární clearance byla v přítomnosti NBMPR (100 nM) významně snížena v obou směrech (z matky do plodu i z plodu do matky), což potvrdilo zapojení ENT1. Použití bezsodíkového média nemělo na transport abakaviru přes potkaní placentu vliv. Uptake studie provedené na lidských placentárních fragmentech odhalily trend ke snížení akumulace abakaviru v přítomnosti inhibitorů ENTs i CNTs.

Závěrem předpokládáme, že zejména ENT1 se může podílet na zajištění koncentrace abakaviru ve fetálním oběhu nutné k prevenci HIV infekce u plodu. Vzhledem k předpokládané variabilitě exprese ENT/CNT je nezbytné pro validní zhodnocení úlohy těchto transportérů v transplacentární kinetice abakaviru u člověka provést studii na širším souboru placent.

*Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR (GAČR P303/120850) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 695912/C/2012, SVV 260 064).*

**VLIV INTEGRÁLNÍCH PEPTIDŮ NA VLASTNOSTI MODELOVÝCH MEMBRÁN****MARIE OLŠINOVÁ, LUKASZ CWIKLIK, MARTIN HOF, MAREK CEBECAUER***Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i.  
Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8  
marie.olsinova@jh-inst.cas.cz*

Membránové proteiny hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech. Transmembránové domény (TMD) umožňují integraci proteinů do membrán a jsou v přímém kontaktu s lipidy. Chemické složení membrány má významný dopad na její organizaci.

Detailní informace o působení TMD na organizaci membrány lze získat studiem vlastností peptidů (reprezentujících TMD) v modelových lipidových membránách<sup>1</sup>. V této práci jsme se zaměřili na zkoumání vlivu struktury peptidů na fyzikálně-chemické vlastnosti a organizaci modelových membrán bez cholesterolu i po jeho přidání. V monolamelárních lipidových vezikulách byly porovnávány tyto peptidy: modelový LW21 peptid a LAT peptid odvozený od transmembránové domény LAT proteinu. Schopnost inkorporace peptidů do membrán různého složení byla testována použitím fluorescenčně značených peptidů a lipidů fluorescenčními metodami včetně fluorescenční kroskorelační spektroskopie (FCCS). Ověřili jsme, že peptid LW21 se nejlépe inkorporuje do lipidové membrány, jejíž šířka odpovídá délce hydrofobní části peptidu. LAT peptid upřednostňuje fluidnější membrány, jejichž lipidová šířka je menší než délka hydrofobní části peptidu. Tento závěr je překvapivý, protože LAT peptid obsahuje delší sekvenci hydrofobních aminokyselin (23 amk) ve srovnání s peptidem LW21 (21 amk). LW21 tvoří v membráně perfektní  $\alpha$ -helix<sup>2</sup>. Naše *in silico* simulace naznačují, že aminokyselina prolin v sekvenci LAT způsobuje ohyb helikální struktury, který může zkracovat aktuální délku peptidu procházejícího lipidovou dvouvrstvou. Metodou z-scan FCS jsme také ukázali, že s rostoucí koncentrací LW21 v membráně klesá laterální mobilita peptidů i lipidů, dochází tedy ke zvýšení rigidity membrány. V přítomnosti cholesterolu jejich mobilita klesá anomálně, pravděpodobně z důvodu aditivního efektu způsobeného přítomností peptidu a cholesterolu.

Získané poznatky naznačují, že sekundární struktura ovlivňuje chování peptidů v modelových membránách. Tyto závěry by mohly pomoci k objasnění mechanismu organizace membránových proteinů v buňkách.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR: P305/11/0459.*

**LITERATURA**

1. de Planque M. R. R., Killian J. A.: *Mol. Membr. Biol.* 20, 4 (2003).
2. Kaiser H. J., Orłowski A., Róg T., Nyholm T. K. M., Chai W., Feizi T., Lingwood D., Vattulainen I., Simons K.: *PNAS* 108, 40 (2011).

**ASSAY PRO ROZLIŠENÍ INTEGROVANÉ A EPISOMÁLNÍ FORMY HPV16, 18, 31 a 56****HANA ONDRYÁŠOVÁ, VLADIMÍRA KOUDELÁKOVÁ, RASTISLAV SLAVKOVSKÝ, VERONIKA VĚNSKOVÁ, JIŘÍ DRÁBEK, MARIÁN HAJDÚCH***Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty  
Univerzity Palackého v Olomouci, 779 00 Olomouc  
ondryasova.hana@gmail.com*

Karcinom děložního čípku je třetí nejčastější malignitou, na jejíž včasný záchyt je v České republice od roku 2008 zaměřen screening, detekující prekancerózní stavy způsobené agresivními subtypy lidského papilomaviru (převážně HPV16 a 18). Problémem screeningu je jeho nízká návštěvnost (v ČR okolo 50 %) a vysoká míra falešné negativity (až 20 %) standardně využívaného cytologického vyšetření. Komerčně dostupná HPV DNA diagnostika pro nejčastější subtypy však také nemá stoprocentní citlivost. Jednou z příčin je nízká virální nálož, pod detekčním limitem metod. Druhou příčinou může být fragmentace genu, na jehož detekci je kit založen, ke které dochází při integraci viru do lidského genomu. Pro správnou diagnostiku cervikálního karcinomu je tedy nezbytné zachytit i část nádorů, u nichž klasické diagnostické kity selhávají.

Cervikální stěry byly testovány systémem Cobas 4800 (Roche) na přítomnost HPV16/18 a dalších hrHPV genotypů (12 hrHPV). Všechny vzorky byly také analyzovány PapilloCheck HPV- Screening system (Greiner Bio-one), který detekuje 18 hrHPV a 6 lrHPV genotypů. Vzorky pozitivní na HPV16, 18, 31 a 56 byly pomocí multiplex real-time PCR assay analyzovány na přítomnost episomální, integrované nebo směsné formy HPV infekce. Jako vnitřní kontrola byl použit gen pro GAPDH.

Podářilo se nám vyvinout a optimalizovat assay založený na multiplex real-time PCR detekující E2 a E6 geny HPV16,18, 31 a 56. Pro HPV E2 i E6 geny všech analyzovaných genotypů jsou detekčním limitem 4 kopie genu na reakci. Touto metodou jsme dosud analyzovali 132 HPV pozitivních patientských vzorků (122 cervikálních stěrů a 10 vaginálních stěrů). Integrovaná nebo směsná forma HPV, spojená se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu děložního čípku, byla nejčastěji detekována u HPV16 pozitivních vzorků (37 %), následně u HPV18 (30 %) a HPV56 (25 %).

Pro ověření schopnosti metody rozlišit pacientky s reálným rizikem vzniku cervikálního karcinomu je nezbytné vyšetřit větší soubor HPV pozitivních patientek se známými cytologickými/histologickými výsledky.

*Tato práce vznikla za podpory grantů: CZ.1.05/3.1.00/14.0307, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, IGA UP LF 2014\_019.*

## IDENTIFICATION OF MOLECULES MEDIATING C-Myb-DEPENDENT CHEMORESISTANCE OF COLORECTAL CARCINOMA CELLS

**LUCIE PEKARČÍKOVÁ, LUCIA KNOPFOVÁ, JAN ŠMARDA**

*Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 629 00 Brno  
222780@mail.muni.cz*

Colorectal carcinoma (CRC) is the third most common cancer and one of the leading causes of cancer-related deaths. The c-Myb transcription factor has been implicated in progenitor cell maintenance and is required for proper cellular differentiation in the hematopoietic system, neuronal cells, skin cells, and colonic crypts. High c-Myb expression is frequently associated with a variety of immature cell lineages, and it decreases as cells differentiate. Although oncogenic versions of c-Myb were originally associated with leukemias, overexpression or rearrangement of the *c-myb* gene is common in several types of solid tumors<sup>1</sup>. Patients with colorectal carcinomas exhibiting upregulated c-Myb expression have poor prognosis<sup>2</sup>. The aim of our study was to clarify the role of c-Myb in control of the cell death/survival of colorectal carcinoma cells treated with cytotoxic agents commonly used in anti-cancer therapies. As model systems we used colorectal carcinoma cell lines CT26 and HCT116 with upregulated c-Myb. We showed that exogenous c-Myb reduced sensitivity of these cells to the cytotoxic agents. Processes associated with cell death/survival may be controlled by oxygen reactive species (ROS)-dependent signalling pathways. Therefore, we tested the levels of ROS and expression/activity of key components of several signalling pathways to identify downstream effectors mediating the effect of c-Myb on cell viability. We identified the enhanced levels of (a) ROS-generating NADPH oxidase (NOX), (b) the phosphorylated MAPKp38, and (c) JNK/c-Jun kinases upon c-Myb overexpression. Using genetic silencing and pharmacological inhibition we proved the link between p38 upregulation and enhanced chemoresistance of CRC cells. Chemoresistance induced by c-Myb is partially sensitive to inhibition of JNK. In this work we documented for the first time that the prosurvival effect of c-Myb is associated with NOX1-dependent regulation of ROS and we discuss the role of c-Myb-ROS axis in activation of MAPKp38 and c-Jun kinases.

*This study was supported by NT13441-4/2012 (IGA, Ministry of Health of the CR), European Regional Development Fund projects CEB (CZ.1.07/2.3.00/20.0183), RECAMO (CZ.1.05/2.1.00/03.0101), IntegRECAMO (CZ.1.07/2.3.00/20.0097).*

### REFERENCE

1. Persson M., Andrén Y., Mark J., Horlings H. M., Persson F., Stenman G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18740 (2009).
2. Biroccio A., Benassi B., D'Agnano I., D'Angelo C., Buglioni S., Mottolese M., Ricciotti A., Citro G., Cosimelli M., Ramsay R., Calabretta B., Zupi G.: *Am. J. Pathol.* 158, 1289 (2001).

## SUBLETÁLNÍ DÁVKA CISPLATINY SENZITIZUJE LIDSKÉ EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY K APOPTÓZE INDUKOVANÉ LIGANDEM TRAIL

**LUCIE PEŠKOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR VINARSKÝ<sup>a</sup>, TOMÁŠ BARTA<sup>b</sup>, ALEŠ HAMPL<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup> Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta, 625 00 Brno, Česká republika, <sup>b</sup> Mezinárodní centrum klinického výzkumu (ICRC), FN u sv. Anny v Brně, 656 91 Brno  
luc.peskova@gmail.com*

Apoptózu indukující ligand ze skupiny tumor nekrotizujícího faktoru – TRAIL – je transmembránový protein indukující apoptózu především u nádorově transformovaných buněk. Díky této vlastnosti je TRAIL vhodným potenciálním kandidátem pro využití v terapii nádorových onemocnění. Ukázalo se však, že některé primární tumory jsou vůči účinkům ligandu TRAIL rezistentní. Mechanismy, které podmiňují tuto rezistenci buněk, nejsou zcela objasněny. Naše skupina v nedávné době popsala molekulární mechanismy rezistence k působení ligandu TRAIL u pluripotentních lidských embryonálních kmenových (EK) buněk. Navíc jsme prokázali, že EK buňky mohou být k účinkům ligandu TRAIL senzitivizovány prostřednictvím inhibice proteosyntézy, a tedy představují unikátní model pro studium molekulárních mechanismů rezistence buněk k ligandu TRAIL.

Cílem této práce bylo zjistit, zda poškození DNA zvyšuje citlivost lidských EK buněk k ligandu TRAIL. Za tímto účelem bylo poškození DNA v EK buňkách indukováno subletální dávkou cisplatinu, běžně používaného cytostatika ze skupiny alkylačních látek, a následně byla sledována odpověď buněk na ligand TRAIL. Naše výsledky ukazují, že vystavení buněk účinku cisplatinu vedlo k formaci 53BP1 a  $\gamma$ H2AX foci, které dokazují přítomnost dvouřetězcových zlomů v DNA, avšak ke změně hladin pro- a antiapoptotických proteinů nedošlo. Kombinace cisplatinu a ligandu TRAIL však vedla k masivní indukci apoptózy, která byla doprovázena štěpením proteinu PARP, kaspázy 8 a plnou aktivací kaspázy 3. Inhibice kaspázy 8 pomocí siRNA vedla ke sníženému štěpení kaspázy 3 a zvýšenému přežívání buněk ošetřených cisplatinou a ligandem TRAIL. To naznačuje, že signalizace vedoucí k ligandem TRAIL indukované apoptóze u EK buněk probíhá právě přes kaspázu 8.

Tato studie přispívá k pochopení molekulárních mechanismů, které podmiňují rezistenci buněk k působení apoptózu indukujícího ligandu TRAIL a prokazuje, že buňky, které jsou rezistentní, mohou být k účinkům ligandu TRAIL relativně snadno senzitivizovány.

*Tato práce byla podpořena European Regional Development Fund - Projekt FNUSA-ICRC (No. CZ.1.05/1.1.00/02.0123), projektem ICRC-ERA-HumanBridge (no. 316345), který je financován Evropskou komisí a MUNI/A/1558/2014, který je financován MŠMT ČR.*

## MODIFIKACE POLY(MLÉČNÉ KYSELINY) RADIKÁLOVÝM ROUBOVÁNÍM PRO APLIKACE V POKROČILÝCH POLYMERNÍCH MATERIÁLECH

JOSEF PETRUŠ<sup>a,b</sup>, FRANTIŠEK KUČERA<sup>a,b</sup>,  
JAROSLAV PETRŮJ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie materiálů, FCH VUT v Brně, 612 00 Brno;

<sup>b</sup>CEITEC – Středoevropský technologický institut VUT,  
616 00 Brno

xcpetrus@fch.vutbr.cz

Uvedená práce se zabývá studiem post-reaktorové modifikace poly(mléčné kyseliny) (PLA) radikálovým roubováním anhydridem kyseliny itakonové (IAH) v tavenině. Reakční podmínky byly zvoleny s ohledem na hodnotu poločasu rozpadu zvoleného iniciátoru (Luperox 101, L101), zpracovatelské podmínky a ve snaze eliminovat nežádoucí degradační reakce PLA v průběhu reaktivní modifikace<sup>1</sup>.

Strukturální analýzou byl proveden kvalitativní důkaz navázaného IAH. U připravených vzorků PLA-g-IAH s různým molárním poměrem IAH/L101 byl stanoven obsah navázaného IAH, přičemž byl potvrzen rostoucí význam roubovací reakce při nižším molárním poměru IAH/L101. Při nejnižších poměrech IAH/L101 byla na základě reologických vlastností taveniny pozorována zvýšená míra vedlejších reakcí, zejména síťování a radikálového větvení. Navázání IAH na PLA řetězec má za následek zvýšení flexibility polymerních řetězců projevující se poklesem teploty skelného přechodu v porovnání s nemodifikovanou PLA. Pokles molekulové hmotnosti PLA-g-IAH při zvyšujícím se obsahu navázaného IAH poukazuje na dvojitý mechanismus adice IAH na PLA řetězec – roubování podél řetězce PLA a roubování na koncích řetězců v důsledku β-štěpení. S měnícím se molárním poměrem IAH/L101 byla pozorována změna reakční entalpie v závislosti na převažujícím druhu reakce (roubování, síťování, reakce IAH a L101, atd.)<sup>2</sup>. Navázáním polárního IAH byla predikována zvýšená adheze PLA-g-IAH k polárním materiálům na základě poklesu kontaktního úhlu na rozhraní PLA-g-IAH–voda.

PLA modifikovaná uvedeným způsobem může nalézt uplatnění jako kompatibilizátor v polymerních směsích a kompozitních materiálech díky reaktivním karboxylovým skupinám obsaženým ve struktuře navázaného IAH. Velký potenciál PLA-g-IAH je v možnosti aplikace v pokročilém druhu polymerních směsí, tzv. „nanoblendy“, u kterých je potlačena nežádoucí vlastnost polymerní mezifáze.

Tato práce vznikla za podpory projektu “CEITEC - Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

### LITERATURA

- Al-Itry R., Lamnawar K., Maazouz A.: Polym. Degrad. Stab. 97, 10 (2012).
- Passaglia E., Siciliano P., Ciardelli F., Maschio G.: Polym. Int. 49, 9 (2000).

## SYNTÉZA DERIVÁTŮ CHINOLONŮ ÚČINKEM BSA S VYUŽITÍM SUBSTITUCE METHOKYSKUPINY NA AROMATICKÉM JÁDŘE

ONDŘEJ PÍŠA<sup>a,b</sup>, STANISLAV RÁDL<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28

Praha 6; <sup>b</sup>Zentiva k.s., 102 37 Praha 10

ondrej\_pisa@centrum.cz

Deriváty 1,4-dihydro-4-oxochinolinu jsou látky, které se využívají zejména jako antibakteriální terapeutika a běžně se označují jako antibakteriální chinolony<sup>1</sup>. V posledních 20 letech se podařilo chinolonového skeletu využít i v případě dalších skupin léčiv. Jako nejslibnější příklady lze uvést inhibitor HIV integrasy elvitegravir<sup>2</sup> (na trh uveden v roce 2012) a kancerostatikum voreloxin (ve 3. fázi klinického vývoje), které působí jako inhibitor topoizomerasy II<sup>3</sup>.

Nejběžnější postupy přípravy<sup>4</sup> znázorňuje Schéma 1. Postup *b* využívá při cyklizaci na aromatickém jádře odstup halogenidů, případně nitro skupiny<sup>5</sup>, a jako báze se nejčastěji využívá potaš.

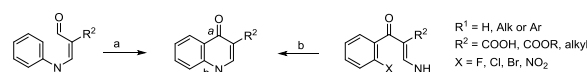


Schéma 1. Běžné postupy přípravy chinolonů

Vzhledem k absenci dostatku příkladů v literatuře má předkládaná práce ambice být rozšířením možností syntézy chinolonů. Zabývá se novým postupem jejich přípravy, kdy se při cyklizaci využívá odstup methoxyskupiny, a to účinkem silylačního činidla bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA). (Schéma 2)

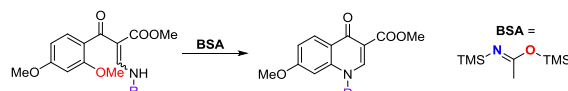


Schéma 2. Syntéza chinolonů s využitím BSA

Metodologie potenciálně nabízí celou řadu výhod: vyšší výtěžky, méně nečistot, nižší reakční teploty a využití levnějších a symetričtějších substrátů, což může být při syntéze nespornou výhodou.

### LITERATURA

- Andriole V.: *The Quinolones*, Third Edition, Academic Press, ISBN 978-0-12-059517-4.
- Gu W.-G.: Biomed. Pharmacother. 68, 917 (2014).
- Hawtin R.E., Stockett D.E., Byl J. A. W., McDowell R.S., Tan N., Arkin M.R., Conroy A., Yang W., Osheroff N., Fox J.A.: PLoS ONE 4, 1 (2010).
- Boteva A. A., Krasnykh O. P.: Chem. Heterocycl. Compd. 45, 757 (2009).
- Rádl S., Bouzard D.: Heterocycles 34, 2143 (1992).

## VLIV KONFORMACE P53 NA AKTIVACI A REPRESI CÍLOVÝCH GENŮ

**ALENA POLÁŠKOVÁ<sup>a</sup>, MATEJ ADÁMIK<sup>a</sup>, ZUZANA BÁBKOVÁ<sup>\*</sup>, ROBERT HELMA<sup>a</sup>, MARIE BRÁZDOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno; <sup>b</sup>Farmaceutická fakulta, VFU Brno, 612 42 Brno  
shemain@ibp.cz

Protein p53 je významný nádorový supresor, který je mutován ve více než 50 % případů nádorových bujení. Obecně patří nádorová onemocnění mezi velmi často diskutovaná témata. V důsledku pokroku v prevenci, včasném odhalení a léčbě nádorů se toto onemocnění dotýká více lidí. Právě při sestavování léčebné strategie může mít stav proteinu p53 velký význam. Mezi jednu z možností protinádorové terapie patří obnova standardní konformace a funkce p53 proteinů.

P53 je nádorový supresor, který díky transaktivaci svých cílových genů (např. *p21*, *BAX*, *MDM2*) při poškození DNA, nedostatku nukleotidů či oxidačním stresu se podílí na zastavení buněčného cyklu, reparaci DNA, apoptóze či autofagii. Navzdory tomu se často v nádorových buňkách vyskytuje v mnohonásobně vyšší koncentraci, než v buňkách zdravých. To je způsobeno především mutacemi jeho genu *TP53*, které mají za následek mimo jiné částečné vyřazení zpětnovazebné negativně regulační smyčky p53-Mdm2. Přítomnost mutantních proteinů se také projevuje aktivací nových cílových genů podporujících proliferaci a přežití buňky a především podporuje rezistenci na cytostatika (např. *GAS1*, *MYC*, *MDR1*). Kombinovaná terapie je klíčová strategie proti získání lékové rezistence<sup>3</sup>.

V naší práci jsme se zaměřili na studium účinků cytostatik v kombinaci s látkami podporujícími obnovu standardní konformace u buněčných linií exprimujících mutantní proteiny p53. Za použití několika typů linií (glioblastomové a linie odvozené od nádoru tlustého střeva), látek obnovující konformaci p53<sup>1,2</sup> a běžně používaných cytostatik (doxorubicin, 5-fluorouracil, cisplatin nebo temozolomid) jsme sledovali vliv těchto kombinací na hladinu p53 a jeho cílových genů jak na úrovni proteinové, tak i na úrovni mRNA. Jednou ze slibných terapií nádorového onemocnění je možnost cílené reaktive konformace mutantní na standardní typ p53 spojená s působením cytostatik.

*Tato práce vznikla za podpory grantu AVČR číslo 13-36108S, IGA VFU Brno 103/2013/FaF a 67/2014/FaF.*

### LITERATURA

- England B., Huang T., Karsy M.: *Tumor Biol.* 34, 2063 (2013).
- Garufi A., Triscioglio D., Porru M., Leonetti C., Stoppacciaro A., D'Orazi V., Avantiaggiati M.L., Crispini A., Pucci D., D'Orazi G.: *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 32, 72 (2013).
- Puca R., Nardinocchi L., Porru M., Simon A.J., Rechavi G., Leonetti C., Givol D., D'Orazi G.: *Cell Cycle* 10, 1679 (2011).

## NOVÉ CHIRÁLNÍ FOTOCITLIVÉ MESOGENNÍ LIGANDY PRO STABILIZACI MAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC V KAPANÝCH KRYSTALECH

**ANNA PORYVAI<sup>a</sup>, MICHAL KOHOUT<sup>a</sup>, ALEXEJ BUBNOV<sup>b</sup>, VLADIMÍRA NOVOTNÁ<sup>b</sup>, JIŘÍ SVOBODA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Fyzikální ústav AV ČR, 182 21 Praha 8  
Poryvaia@vscht.cz

Jednou z možností stabilizace kapalně krystalických maticí, je použití nanočástic, jejichž přidávek vede ke snížení viskozity výsledného materiálu a zlepšení kontaktu molekul kapalného krystalu s povrchem pixelu<sup>1</sup>.

Nanočástice, které nebyly nijak modifikovány, vytvářejí s kapalně krystalickými maticemi nestabilní koloidní systémy a rychle agregují<sup>2</sup>. Pro přípravu stabilních systémů se proto používají nanočástice modifikované nejrůznějšími surfaktanty. Největší stabilizace nanočástic lze dosáhnout použitím směsi mesogenních ligandů a jednoduchého surfaktantu (např. kyselina olejová)<sup>3</sup>. V tomto případě však dochází k významným topologickým změnám v uspořádání ligandů vázaných na nanočástici<sup>4</sup>, což ve výsledku negativně ovlivňuje vlastnosti cílového materiálu.

V této práci jsme se zaměřili na přípravu nanočástic (Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>, Co) stabilizovaných výhradně mesogenem. Na základě našich předchozích výsledků<sup>5</sup> byla navržena struktura ligandů s fosfonovou terminální funkční skupinou, u kterých předpokládáme vznik chirální mesofáze (Schéma 1).

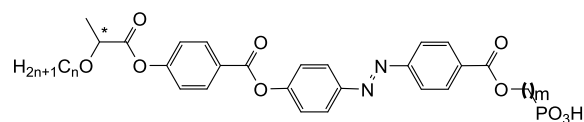


Schéma 1. Obecná struktura ligandů

*Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR 13-07397P a GA ČR 15-02843S.*

### LITERATURA

- Chandran A., Prakash J., Naik K. K., Srivastava, A. K., Dabrowski R., Czerwinski M., Biradar A. M.: *J. Mater. Chem. C* 2, 1844 (2014).
- Xu J., Bedrov D., Smith G., Glaser M.: *Phys. Rev. E* 79 (2009).
- Scharf T., Dintinger J., Tang B.-J., Mehl G. H., Zeng X., Ungar G., Mühlig S., Kienzler T., Rockstuhl C.: *Emerging Liquid Crystal Technologies* 86420J (5.03.2013).
- Draper M., Saez I. M., Cowling S. J., Gai P., Heinrich B., Donnio B., Guillon D., Goodby J. W.: *Adv. Funct. Mater.* 21, 1260 (2011).
- Poryvai A., Bubnov A., Kohout M., Novotná V., Svoboda J.: *The 41. German Liquid Crystal Conference in Magdeburg* (25.02.-27.02.2014) s. 22.

## CHARAKTERIZACE STRUKTURY RECEPTORU DENDRITICKÝCH BUNĚK DCL-1 (CD302) VIA NMR A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

**ELIŠKA POSPÍŠILOVÁ, JOSEF CHMELÍK, ZDENĚK KUKAČKA, DANIEL KAVAN, PETR NOVÁK**

*Katedra biochemie, PŘF, Univerzita Karlova v Praze, 128 43 Praha 2; Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., 142 20 Praha 4  
eosp@biomed.cas.cz*

CD302 je extracelulární receptor C-lektinového typu exprimovaný na myeloidních buňkách. U CD302 byly prokázány endocytické vlastnosti a vzhledem k jeho kolokalizaci s F-aktinem se pravděpodobně podílí i na buněčné adhezi a migraci. Vazba sacharidů zatím prokázána nebyla. Pokud k ní bude docházet, s největší pravděpodobností se tak nebude dít klasickou cestou přes koordinaci s vápenatými kationty. CD302 byl poprvé objeven jako fúzní partner receptoru CD205. Fúzní protein se od obou jednotlivých receptorů liší lokalizací i funkcí.

Pro strukturální studie byla exprimována extracelulární část receptoru obsahující kompletní C-lektinovou doménu. Rekombinantní protein byl produkován v buňkách *E. coli* BL21 v LB médiu a M9 minimálním médiu (pro NMR studie za přítomnosti  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ ) do inkluzních tělísek, která byla izolována a solubilizována. Rekombinantní protein byl *in vitro* složen a purifikován gelovou filtrací.

Strukturální model rekombinantního CD302 je založen na meziatomových vzdálenostech získaných přiřazením  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC spekter naměřených NMR. Pro výpočet struktur v programu ARIA/CNS byly dále použity sekundární struktury předpovězené na základě chemických posunů atomů proteinové páteře (program TALOS+).

Hmotnostní spektrometrie potvrdila zapojení disulfidových můstků odpovídající C-lektinové doméně. Spolu s intramolekulárními vzdálenostmi získanými chemickým zesílením a dihedralními úhly předpovězenými podle NMR byla tato informace použita pro vytvoření homologního modelu v programu MODELLER (templát: kolektein 12) a následně porovnána se souborem struktur získaných pouze NMR.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 797213, GACR P207/10/1040, CZ.1.07/2.3.00/20.0055, CZ.2.16/3.1.00/24023 a RVO61388971.*

## CHEMICKÁ MODIFIKACE A CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ Z PŘÍRODNÍHO POLYSACHARIDU GUM KARAYA

**HANA POŠTULKOVÁ<sup>a\*</sup>, IVANA CHAMRADOVÁ<sup>a,b</sup>, LUCY VOJTOVÁ<sup>b</sup>, JOSEF JANČÁŘ<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>CEITEC - Středoevropský technologický institut VUT, 616 00 Brno; <sup>b</sup>Ústav chemie materiálů, Fakulta chemická VUT v Brně, 612 00 Brno  
Hana.Postulkova@ceitec.vutbr.cz*

Gum Karaya (GK) je přírodní guma pocházející ze stromu *Sterculia urens*. GK je částečně acetylovaný, nerozpustný a aniontový polysacharid<sup>1</sup> a je získáván jako vápenatá nebo hořečnatá sůl<sup>2</sup>. GK obsahuje  $\beta$ -D-galaktosu, L-rhamnosu,  $\beta$ -D-glukuronovou kyselinu a kyselinu D-galakturonovou<sup>3</sup>.

Nerozpustnost GK je způsobena přítomností dvojmocných iontů a acetylových skupin ve struktuře GK<sup>4</sup>. Tato studie se zabývá přečištěním a chemickou (alkalickou) modifikací GK pro vývoj rozpustného materiálu k následnému využití v medicíně (např. hydrogelů pro regeneraci měkkých tkání a systémů pro distribuci léčiv).

V práci byly optimalizovány podmínky modifikační reakce např. typ hydroxidu, koncentrace roztoku GK a čas reakce. Originální GK a modifikované vzorky GK byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), infračervené spektrometrie (FTIR), termogravimetrické analýzy (TGA), diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), nukleární magnetické rezonance (NMR) a reologickými studiemi. Byla stanovena lineární viskoelastická oblast pro různé koncentrované roztoky. Dále byl studován vliv NaCl na viskozitu originálního vzorku GK. Klesající viskozita roztoku GK s vyšším obsahem NaCl byla vysvětlena výměnou dvojmocných iontů za jednomocné ve struktuře polysacharidu.

*Tato práce vznikla za podpory projektu "CEITEC - Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).*

## LITERATURA

1. Singh B., Sharma V., Pal L.: Carbohydr. Polym. 86, 1371 (2011).
2. Verbeke D., Dierckx S., Dewettinck K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 10 (2003).
3. Silva D.A., Brito A.C.F., de Paula R.C.M., Feitosa J.P.A., Paula H.C.B.: Carbohydr. Polym. 54, 229 (2003).
4. Le Cerf D., Irinei F., Muller G.: Carbohydr. Polym. 13, 375 (1990).

## IDENTIFIKACE PROGNOSTICKÝCH A PREDIKTIVNÍCH FAKTORŮ U PACIENTŮ S NEMALOBUNĚČNÝM KARCINOMEM PLIC LÉČENÝCH V ADJUVANTNÍM REŽIMU

**JANA POTOČKOVÁ, R. TROJANEC, J. DRÁBEK, J. STRÁNSKÁ, J. VRBKOVÁ, V. KOUDELÁKOVÁ, S. MLČOCHOVÁ, Z. CRLÍKOVÁ, I. GRYGÁRKOVÁ, M. HAJDÚCH**

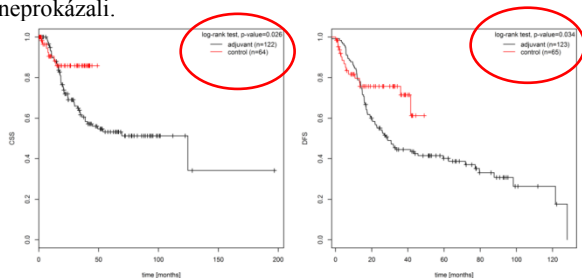
*Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, 779 00 Olomouc; Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, Fakultní nemocnice, 779 00 Olomouc  
Jana.potockova@seznam.cz*

Karcinomy plic představují v ČR jednu z nejčastějších skupin nádorů vůbec a lze je rozdělit podle několika kritérií jako je biologické chování nádoru, histologické složení či lokalizace do několika skupin. Pro praxi má však největší

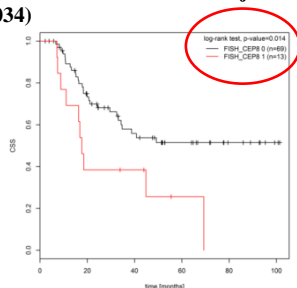
význam dělení na malobuněčný karcinom SCLC (asi 20-25%) a nemalobuněčný karcinom NSCLC (75-80%). NSCLC obvykle vykazuje ve srovnání s SCLC pomalejší růst, takže v praxi bývají příznivější možnosti chirurgického odstranění za předpokladu, že nádor již nevytvořil metastatická ložiska. Na protinádorovou léčbu cytostatiky a radioterapii reaguje o něco hůře než malobuněčný karcinom. I proto se stal NSCLC předmětem naší práce.

V naší studii byl vyšetřován soubor 124 pacientů s NSCLC, léčených v adjuvantním režimu kombinací derivátů platiny s vinorelbinem. Jako materiál byly použity FFPE řezy. Metodou FISH byl vyšetřen status genů EGFR, FGFR, C-MET, přítomnost přestavby v ALK a ROS1 genech, a počet kopií chromozomu 7,8. Zároveň, metodou qPCR byla vyšetřena přítomnost mutací v genech K-RAS a B-RAF.

Byla provedena statistická analýza klinických a laboratorních výsledků. Jako kontrolní byl použit soubor 65 pacientů s NSCLC, kteří byli léčeni pouze chirurgicky a nebyli zařazeni do adjuvantního režimu léčby. Některé statisticky významné korelace jsme předem očekávali – např. distribuce pacientů podle stadia nebo věku v adjuvantní a kontrolní skupině. Z hlediska celkového přežití (OS) nebyl zaznamenán mezi adjuvantní a kontrolní skupinou statisticky významný rozdíl. Jinak je tomu při srovnání adjuvantní a kontrolní skupiny z hlediska CSS a DFS (Obr. 1 A,B). Zajímavé je zjištění, že ve skupině adjuv. léčených pacientů je statisticky významným faktorem pro OS a DFS ROS1 translokace (nízký výskyt, výsledek je třeba verifikovat na větším počtu pacientů) a pro CSS polysomie CEP8 (Obr. 2). Význam jiných vyšetřovaných FISH markerů jsme dosud neprokázali.



Obr.1: (A) Srovnání CSS mezi adjuvantní a kontrolní skupinou ( $P=0,026$ ) (B) Srovnání DFS mezi adjuvantní a kontrolní skupinou ( $P=0,034$ )



Obr.2: Porovnání počtu kopií CEP8 z hlediska CSS (0 - wildtype of CEP8, 1 - polysomy of CEP8;  $P=0,014$ )

Tato práce byla podpořena grantovými projekty IGA MZ ČR NT/13569 a BIOMEDREG CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

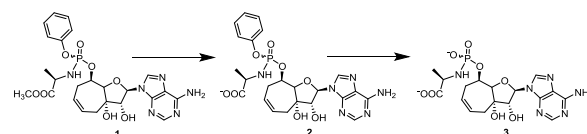
## KONFORMAČNÍ ANALÝZA A ENZYMOVÉ ŠTĚPENÍ FOSFORAMIDÁTOVÉHO PROLÉČIVA KONFORMAČNĚ UZAMČENÉHO NUKLEOSIDU

**ELIŠKA PROCHÁZKOVÁ, HUBERT HŘEBABECKÝ, RADIM NENCKA, MARTIN DRAČÍNSKÝ**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i.,  
Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha  
prochazkova@uochb.cas.cz

Ribosový cyklus obsažený v přirozených nukleosidech je velmi flexibilní a v roztoku tak může existovat rovnováha několika konformerů. Vhodnou kovalentní modifikací cukerné části lze tento pohyb zbrzdít natolik, že jeden konformer bude výrazně stabilnější. Takto modifikované nukleosidy se označují jako konformačně uzamčené a byla u nich prokázána antivirová aktivita<sup>1</sup>. Vzhledem k vyšší polaritě nukleosidů se připravují lipofilnější deriváty, které snadněji prochází přes buněčnou membránu. U nukleosidů se často zavádí fosforamidátová skupina<sup>2</sup>, která je následně odštěpena intracelulárními enzymy.

V této práci byla studována konformace konformačně uzamčeného nukleosidu <sup>1</sup>H NMR spektroskopii v kombinaci s DFT výpočty. Naměřené hodnoty protonových interakčních konstant byly porovnány s hodnotami vypočtenými pro různé konformace a byl nalezen jeden stabilní konformer (<sup>2</sup>E). Od tohoto nukleosidu byl připraven fosforamidátový derivát **1** a jeho enzymové štěpení karboxypeptidasou Y bylo sledováno pomocí <sup>31</sup>P NMR spektroskopie. Výchozí látka obsahuje chirální centrum na fosforovém atomu, existují tedy dva diastereoizomery, které lze pozorovat v <sup>31</sup>P NMR spektru jako dva signály. Po přidání enzymu byl substrát po několika minutách přeměněn na meziprodukt **2**, který se za několik hodin rozpadl na konečný produkt **3**. Stejně produkty byly detekovány po chemické hydrolyze triethylaminem. Strukturu produktů bylo možné určit *in situ* z 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) a 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR spekter a díky C-P spin-spinovým interakcím. Strukturální modifikace proléčiva **1** nevede k inhibici enzymu a dochází k předpokládané metabolické reakci.



Obr. 1. Enzymové štěpení fosforamidátového proléčiva

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 13-24880S a grantu P207/12/P625.

### LITERATURA

- Šála M., De Palma A. M., Hřebabecský H., Nencka R., Dračínský M., Leyssen P., Neyts J., Holý A.: *Bioorg. Med. Chem.* 9, 473 (2010).
- Saboulard D., Naesens L., Cahard D., Salgado A., Pathirana R., Velazquez S., McGuigan Ch., De Clercq E., Balzarini J.: *Mol. Pharmacol.* 56, 693 (1999).



## SYNERGICKÝ ÚČINEK NANOČÁSTIC STŘÍBRA A ANTIBIOTIK V BOJI PROTI ZVÍŘECÍM BAKTERIÍM

**MONIKA SMĚKALOVÁ<sup>a</sup>, VIRGINIA ARAGON<sup>b</sup>, ALEŠ PANÁČEK<sup>a</sup>, LIBOR KVÍTEK<sup>a</sup>, RADEK ZBOŘIL<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Univerzita Palackého v Olomouci, 783 71 Olomouc; <sup>b</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain  
monika.smekalova@upol.cz

Antibiotika jsou hojně využívána k léčbě a prevenci hospodářských zvířat, což má za následek rychlý rozvoj a šíření bakteriální rezistence<sup>1</sup>. Vzhledem ke snížené efektivitě antibiotik je nezbytné hledat jiné způsoby boje proti infekčním chorobám zvířat. Nanočástice stříbra (AgNP) jsou dobře známy svými antimikrobiálními vlastnostmi<sup>2</sup>. Proto jsme studovali možné zvýšení účinku antibiotik v kombinaci s AgNP.

K tomuto účelu byly syntetizovány AgNP o průměrných velikostech 8 a 28 nm a byl hodnocen vliv na čtyři antibiotika s různými mechanismy účinku. Pro srovnání minimálních inhibičních koncentrací AgNP a antibiotik samotných a ve vzájemné kombinaci byla použita šachovnicová metoda a z frakčního inhibičního koncentračního indexu se usuzovalo, zda je interakce synergická, aditivní, indiferentní nebo antagonistická.

Ze 40 kombinací AgNP, antibiotika a bakterie, bylo 7 synergických, 17 aditivních a 16 indiferentních. Žádná kombinace nebyla antagonistická. Většinu synergických kombinací vykazoval gentamicin, ale nejsilnější kombinovaný účinek se projevil u kombinace penicilinu G s AgNP proti bakterii *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Navíc po kombinaci nanočástic s gentamicinem, amoxicilinem a kolistinem vůči bakteriím *A. pleuropneumoniae* a *Pasteurella multocida* se obnovila citlivost bakterií k uvedeným antibiotikům. Studie dokazuje, že AgNP mohou být potenciálně využity ve veterinárním lékařství jako adjuvant.

Tato práce vznikla za podpory projektů MŠMT ČR LO1305, CZ.1.07/2.3.00/20.0056 a CZ.1.07/2.4.00/31.0130 a Interního grantu UP v Olomouci, projekt PrF\_2014\_032.

### LITERATURA

- Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T. R.: Int. J. Antimicrob. Agents 17, 431 (2001).
- Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V. K., Nevěčná T., Zbořil R.: J. Phys. Chem. B 110, 16248 (2006).

## CHARAKTERIZACE INTERAKCE PROTEINŮ DVOUSLOŽKOVÉHO SIGNÁLNÍHO SYSTÉMU AfGcHK A RR ZA POMOCI VODÍK-DEUTERIOVÉ VÝMĚNY

**MARTIN STRÁŇAVA, PETR MAN, VÁCLAV MARTÍNEK, VERONIKA FOJTÍKOVÁ, TORU SHIMIZU, MARKÉTA MARTÍNKOVÁ**

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2  
stranova@natur.cuni.cz

Bakteriální senzory proteiny se díky své důležitosti v lidské patogenezi ukazují být zajímavým cílem zásahu antibiotik nové generace. Typická struktura těchto proteinů se vyznačuje přítomností senzory domény na N-konci (detekující signály z prostředí) a funkční domény na C-konci (mající enzymovou aktivitu a/nebo provádějící příslušné specifické biologické funkce). Do této skupiny řadíme i nedávno popsaný senzory protein s histidinkinasovou aktivitou (AfGcHK) pocházející z bakterie *Anaeromyxobacter* sp. AfGcHK patří mezi kyslíkové senzory s globinovou strukturou senzory domény. Hem, který je vázán na senzory doménu poměrně pevně, je po redukci jeho centrálního iontu železa z formy Fe(III) na Fe(II) schopen vazby molekuly kyslíku (O<sub>2</sub>). Koordinace tohoto ligandu vyvolá v senzory doméně konformační změny, které jsou zodpovědné za následnou aktivaci katalytické domény. Aktivovaná funkční doména s histidinkinasovou aktivitou katalyzuje autofosforylaci His183 za vzniku fosforylovaného proteinu, který je následně schopen tento fosfát přenést na aspartát druhého proteinu signální dráhy označovaného jako Regulátor odpovědi (RR). Aktivovaný RR může v buňce plnit různé funkce, nejčastěji však vystupuje v roli transkripčního aktivátoru regulujícího např. homeostázi, virulenci nebo přestavbu buněčné stěny za nepříznivých životních podmínek.

Přesný mechanismus přenosu fosfátu z histidinkinasy a aktivace RR proteinu nejsou dosud detailně popsány. V prezentované práci jsme se zaměřili na charakterizaci interakce proteinů AfGcHK a RR za pomoci vodík-deuteriové výměny a analytické ultracentrifugace. Tyto dvě techniky nám umožnily zjistit základní parametry komplexu, nalézt vzájemné interakční oblasti a popsat konformační změny v průběhu interakce. Naměřená data ukazují, že pro vazbu histidinkinasy na RR protein jsou důležité dva  $\alpha$ -helixy v centrální části proteinu, přičemž součástí jednoho z nich je i His183. RR protein interaguje s AfGcHK rovněž pomocí dvou helixů v blízkosti aktivního centra obsahujícího Asp52. Další detaily interakce mezi AfGcHK a RR budou diskutovány.

Tento projekt byl podpořen Univerzitou Karlovou v Praze – projekt UNCE 204025/2012 a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy projekt č. 756214.

## TVORBA MATRIC Z HEDVÁBÍ *Antheraea pernyi*, JEJICH CHARAKTERIZACE A VYUŽITÍ PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

**LENKA STRNADOVÁ, MICHAELA JEČNÁ, ZDENĚK KNEJZLÍK, TOMÁŠ RUML**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Lenka.Strnadova@vscht.cz*

Hedvábí je přírodní biopolymer proteinového základu, produkovaný mnoha druhy pavouků a hmyzu. Základní komponentou hedvábí motýlů je vysoce repetitivní protein fibroin. Struktura tohoto proteinu se skládá z hydrofilních (N a C konec) a hydrofobních (repetitivních a nerepetitivních) úseků. Pravidelné střídání těchto úseků umožňuje skládání fibroinových podjednotek do podoby finálního vlákna<sup>1</sup>. Ukázalo se, že díky vysoké biokompatibilitě, biodegradabilitě, teplotní stabilitě a dobrým mechanickým vlastnostem mají hedvábné materiály velký potenciál pro využití v regenerativní medicíně<sup>2</sup>.

V naší práci jsme se zaměřili na hedvábí motýla druhu *Antheraea pernyi*. Naším cílem je příprava fibroinových vrstev s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a následná charakterizace těchto vrstev se zaměřením na jejich biodegradabilitu, zejména s ohledem na plánované využití fibroinových vrstev v biomedicíně.

Úspěšně jsme vyvinuli zcela nový postup přípravy solubilizace fibroinu z vypeparovaných žláz housenek *A. pernyi*. Z připraveného roztoku fibroinu byly připravovány 2-D matrice, které byly dále charakterizovány. Byla provedena SEM a AFM analýza připravených vrstev, díky kterým jsme pozorovali rozdíly v povrchovém uspořádání vrstev v závislosti na způsobu jejich přípravy. Byla změněna smáčivost vrstev metodou statické goniometrie. Bylo zjištěno, že matrice inkubované ve vodných roztocích jsou hydrofilní, zatímco neošetřené matrice vykazují silně hydrofobní vlastnosti. Jelikož biodegradabilita matric je pro využití v regenerativní medicíně důležitým parametrem, byla testována také stabilita obdržených vrstev vůči působení serinové proteasy trypsinu. Bylo zjištěno, že změnou podmínek použitých pro přípravu vrstev je možné modulovat jejich odolnost vůči proteolyse.

Připravené vrstvy jsou dále využívány pro kultivace tkáňových kultur lidských keratinocytů a myších embryonálních fibroblastů, abychom ověřili možnost jejich potenciálního využití v regenerativní medicíně. Doposud provedené kultivace tkáňových kultur buněk lidských keratinocytů (HaCaT) na připravených vrstevnatých matricích prokazují vhodnost připravených materiálů pro tyto účely.

*Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 20/2015).*

### LITERATURA

- Gosline J., Guerette P., Ortlepp C., Savage K.: *Comp. Biochem. Phys. A* 124, 34 (1999).
- Vepari C., Kaplan D. L.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 991 (2007).

## STUDIUM SEKRECE VISFATINU U ADIPOCYTŮ, HEPATOCYTŮ A MAKROFÁGŮ

**PETR SVOBODA<sup>a</sup>, EDITA KRÍŽOVÁ<sup>a</sup>, KAMILA ŠIGUTOVÁ<sup>a</sup>, JARMILA ZÍDKOVÁ<sup>a</sup>, VÁCLAV ZÍDEK<sup>b</sup>, VOJTĚCH ŠKOP<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup> Fyziologický ústav, AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4  
svoboda-petr@tiscali.cz*

Metabolický syndrom, imunitní systém a syntéza NAD<sup>+</sup> jsou oblasti působení adipokinu visfatinu. Jeho přítomnost v krevní plasmě vyústila v otázku, zda je uvolňován z buněk cestou aktivní sekrece nebo nikoliv. Protože chybějící N-koncový signál neumožňuje visfatinu využít klasický sekreční mechanismus s počátkem v endoplasmatickém retikulu, případná aktivní sekrece by probíhala jednou z neklasických drah. Prozatím nebyl objeven způsob regulace ani mechanismus tohoto procesu a není zcela objasněno, které typy buněk visfatin aktivně sekretují. Naším cílem bylo potvrdit aktivní sekreci visfatinu u buněčných kultur zastupujících adipocyty, hepatocyty a buňky imunitního systému.

Modelové buněčné linie zahrnovaly HepG2 hepatocyty, U-937 monocytů a makrofágy a 3T3-L1 preadipocyty a adipocyty. Diferenciace monocytů U-937 trvala 4 dny a byla započata přidáním aktivačního činidla forbol-12-myristát-13-acetátu (PMA). Diferenciace 3T3-L1 preadipocytů v adipocyty probíhala 8 dní a byla zahájena přidávkem dexamethasonu, isobutylmethylxanthinu a insulinu. Buňky byly transfekovány vektory, které nesou hemaglutininem (HA) značený visfatin a HA značený zelený fluorescenční protein (GFP). Sekrece visfatinu, HA-visfatinu a HA-GFP byla sledována metodou imunoblotu. Jako kontrolní protein byl použit cytosolický enzym glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa (GAPDH).

V médiích linie 3T3-L1 preadipocytů nebyl visfatin detekován vůbec. U buněk adipocytů a HepG2 byl visfatin vždy za přítomnosti GAPDH, přičemž poměr množství visfatinu a GAPDH v médiích a v buněčných lysátech byl srovnatelný. V médiích buněk HepG2 byl HA značený visfatin detekován pouze slabě, navíc zde bylo opět velké množství GAPDH. V médiích byl však v podobné míře jako HA-visfatin detekován také HA-GFP, což je protein, který není buňkami aktivně sekretován. Signifikantní hladina visfatinu byla detekována pouze u zralých makrofágů U-937.

Výsledky ukazují, že visfatin není buňkami adipocytů ani hepatocytů aktivně sekretován, ale je pasivně uvolňován v důsledku buněčné smrti. Makrofágy tak byly jedinou studovanou buněčnou kulturou, u níž byla potvrzena aktivní sekrece visfatinu. Tuková tkáň, která je spojována se sekrecí visfatinu, však není tvořena pouze adipocyty, ale i dalšími buněčnými typy, z nichž významnou roli hrají buňky imunitního systému. Tyto buňky tak mohou, kromě dalších funkcí, představovat hlavní producenty visfatinu.

*Práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (rozhodnutí č. 20/2015).*

## ANALÝZA ĽUDSKEJ aDNA Z HISTORICKÉHO BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

LUKÁŠ ŠEBEST<sup>a</sup>, MARIÁN BALDOVIČ<sup>a</sup>, CSABA BOGNÁR<sup>a</sup>, ĽUDEVÍT KÁDASI<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava; <sup>b</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava  
lukas.sebest@atlas.sk

Archaickou DNA (aDNA) sa nazývajú všetky nukleové kyseliny, ktoré je možné izolovať z archeologických nálezov, múzejných preparátov alebo čiastočne fosilizovaných materiálov.

Informácie obsiahnuté v sekvenciách aDNA si našli svoje uplatnenie v mnohých vedných odboroch a disciplinách. Avšak asi najviac sa využívajú vo výskume dávnych ale aj pomere recentnejších udalostí v histórii moderných ľudí. Predovšetkým pri mapovaní historických migračných ciest<sup>1</sup>, v paleopatologických<sup>2</sup> a genealogických štúdiách<sup>3</sup>, a takisto aj vo forenzných štúdiách pri identifikácii obetí vojen a revolúcií<sup>4</sup>.

Nevýhodou práce s aDNA je to, že sa v pozostatkoch nachádza vo veľmi nízkych koncentráciách a navyše je značne degradovaná, čo je výsledkom pôsobenia chemických, fyzikálnych a biologických faktorov prostredia. Okrem toho neustále hrozí riziko jej kontaminácie modernou DNA, preto je nutné dodržiavať prísne laboratórne a pracovné pravidlá<sup>5</sup>.

V našej práci sme na izoláciu a analýzu aDNA použili súbor 65 vzoriek ľudských kostrových pozostatkov pochádzajúcich zo slovansko-avarského pohrebiska z 8.-9. storočia (kataster obce Cífer-Pác). Z jednotlivých vzoriek aDNA sme stanovovali pohlavie amplifikáciou amelogenínového génu a fragmentovou analýzou PCR produktov, a taktiež určovali mitochondriálne haplogrupiny amplifikáciou a následným osekvenovaním HVRI mitochondriálnej DNA.

Úspešne sme stanovili pohlavie zo vzoriek pochádzajúcich z detských alebo nekompletných kostier, u ktorých to nebolo možné stanoviť bežnou antropomorfológickou metódou. Okrem haplogrupín charakteristických pre slovanské národy sme zistili výskyt dvoch haplogrupín typických pre oblasť Kaukazu, čo zodpovedá faktu, že sa jednalo o zmiešané slovansko-avarské pohrebisko. Okrem toho sme na základe porovnania zistených polymorfizmov v HVRI dokázali určiť príbuzenské vzťahy niektorých jedincov.

### LITERATÚRA

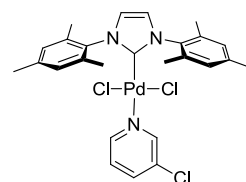
1. Endicott P., Gilbert M.P.T., Stringer C.: Am. J. Hum. Genet. 72, 178 (2003).
2. Anastasiou E., Mitchell P.D.: Gene 528, 33 (2013).
3. Keyser-Tracqui E., Cubrézy E., Ludes B.: Am. J. Hum. Genet. 73, 247 (2003).
4. Coble M.D., Loreille O.M., Wadhams M.J., Edson S.M., Maynard K., Meyer C.E., Niederstätter H., Berger C., Berger B., Falsetti A.B., Gill P., Parson W., Finelli L.N.: PloS one 4, e4838 (2009).
5. Cooper A., Poinar H.N.: Science 289, 1139 (2000).

## PŘÍPRAVA A REAKTIVITA PALLADIOVÝCH KATALYZÁTORŮ S CHIRÁLNÍMI POLYFLUOROVANÝMI NHC LIGANDY

ONDŘEJ ŠIMŮNEK, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ, JAROSLAV KVÍČALA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 166 28 Praha 6 - Dejvice  
ondrej.simunek@vscht.cz

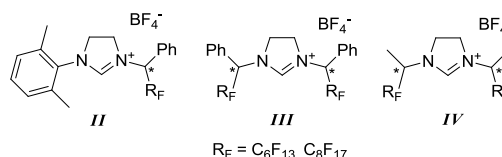
Homogenní palladiové katalyzátory nesoucí NHC ligandy jsou díky své stabilitě a všestranné katalytické aktivitě hojně používány v moderní organické syntéze. Typickým příkladem je PEPPSI katalyzátor **I** (z angl. Pyridine-Enhanced Precatalyst Preparation, Stabilization and Initiation), využívaný např. v Suzukiho couplingu nebo Heckově reakci<sup>1</sup>.



Obr. 1. PEPPSI katalyzátor **I**

V rámci této práce jsem se zaměřil na přípravu analogů těchto katalyzátorů s polyfluorovanými chirálními NHC ligandy, díky nimž se tyto katalyzátory stávají stereoselektivní a zároveň fluorofilní, což umožňuje jejich následnou recyklaci pomocí fluorových separačních technik.

K přípravě těchto katalyzátorů bylo jako prekurzorů NHC ligandů použito několik strukturálně odlišných typů chirálních polyfluorovaných dihydroimidazoliových solí **II** – **IV**, syntetizovaných v naší laboratoři.



Obr. 2. Použité polyfluorované dihydroimidazoliové soli

Stereoselektivita připravených katalyzátorů byla studována na asymetrickém Suzukiho couplingu, poskytujícím axiálně chirální binaftylové deriváty.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014) a z grantu GA ČR č. 207/10/1533.

### LITERATURA

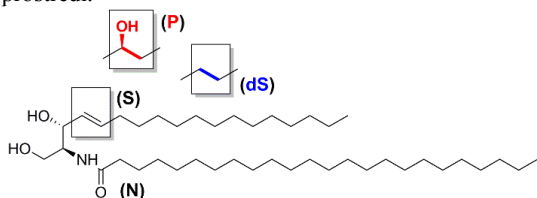
1. O'Brien Ch. J., Kantchev E. A. B., Valente C., Niloufar Ch. G. A., Lough A., Hopkinson A., Organ M. G.: Chem. Eur. J. 12, 4743 (2006).

## STUDIUM LIPIDOVÝCH MEMBRÁN JAKO MODELŮ KOŽNÍ BARIÉRY S VYUŽITÍM DEUTEROVANÝCH CERAMIDŮ

**BARBORA ŠKOLOVÁ, KLÁRA HUDSKÁ, KATEŘINA VÁVROVÁ**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 500 05 Hradec Králové  
Skolb5aa@faf.cuni.cz

Nejvrchnější vrstvu kůže tvoří keratinem vyplněné buňky obklopené lipidovou matrix tvořenou směsí ceramidů (Cer), volných mastných kyselin (MK) a cholesterolu (Chol). Strukturu Cer představuje obr. 1, molekula je tvořena aminoalkoholem - sfingosinem (S), fytosfingosinem (P) nebo dihydrosfingosinem (dS), jehož primární aminoskupina je acylována mastnou kyselinou (N). Podstata bariérové funkce kůže je dána vlastnostmi mezibuněčné hmoty, tedy jejím složením i uspořádáním, které není zcela objasněno. Abychom lépe porozuměli vztahům mezi strukturou Cer a jejich bariérovou funkcí, studujeme jejich vlastnosti v lipidových modelech kožní bariéry pomocí permeačních pokusů a biofyzikálních metod, např. infračervené spektroskopie. V lipidových membránách obsahujících deuteriem značené a neznačené složky je jejich chování (fázové přechody, konformace či laterální uspořádání řetězců) pozorováno současně, avšak odděleně díky odlišné poloze vibračních pásů ne- a značených látek. V této studii byly nejprve syntetizovány tři typy kožních Cer s deuterovaným acylem (d-Cer) a následně připraveny lipidové membrány kožní bariéry v kombinacích d-Cer/Cer, deuterovaná/neznačená MK a Chol. Při teplotě kožního povrchu (tj. 32 °C) jsou acylové řetězce Cer (N) konformačně uspořádanější (*trans*), zatímco u sfingosinových řetězců (obecně) převažuje volnější *gauche* konformace. Membrány obsahující Cer odvozené od fyto-(NP) a dihydrosfingosinu (NdS) jsou teplotně stabilnější ve srovnání s modelem obsahující sfingosinový Cer (NS), jehož řetězce jsou však v těsnějším laterálním uspořádání, a Cer (NS) se také lépe mísí s MK. Zajímavým poznatkem je, že Cer (NS) upřednostňuje velmi neobvyklou otevřenou konformaci řetězců orientovaných do opačných směrů, což patrně souvisí s velmi nízkou permeabilitou lipidových membrán. Každý typ Cer má tedy zřejmě specifickou funkci a jejich heterogenní směs lépe odolává vlivům okolního prostředí.



Obr. 1. Strukturální typy Cer (NP), Cer (NS) a Cer (NdS), zkratky označují acyl mastné kyseliny (N) a typ sfingosinu (S, P, dS)

Tato práce vznikla za podpory Univerzity Karlovy (SVV 260062) a Grantové agentury ČR (13-23891S).

## PŘÍPRAVA BIOPOLYMERNÍCH NANOVLÁKEN VHODNÝCH PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE

**VERONIKA ŠVACHOVÁ<sup>a</sup>, LUCY VOJTOVÁ<sup>b</sup>, JOSEF JANČÁŘ<sup>a,b</sup>, DAVID PAVLIŇÁK<sup>c</sup>, PAVEL HYRŠL<sup>d</sup>**

<sup>a</sup>Ústav chemie materiálů, FCH, VUT v Brně, 612 00 Brno;

<sup>b</sup>CEITEC – Středoevropský technologický institut VUT,

616 00 Brno; <sup>c</sup>Ústav fyzikální elektroniky, Masarykova universita, 602 00 Brno; <sup>d</sup>Institut experimentální biologie, Masarykova universita, 61137 Brno

xcsvachova@fch.vutbr.cz

Předložená práce se zabývá přípravou (bio)polymerních nanovláken získaných pomocí technologie zvláknování z volné hladiny roztoku polymeru v silném elektrostatickém poli technologii Nanospider<sup>®</sup>.

Úspěšně byla připravena želatinová nanovláknina, modifikovaná přídavkem sodné, případně vápenaté soli oxidované celulosy<sup>1</sup>. Želatina je biokompatibilní, biodegradabilní a má vysokou absorpční schopnost. Oxidovaná celuloza i její soli jsou biokompatibilní, biodegradabilní, vykazují jak hemostatické, tak baktericidní účinky.

Dalším důležitým krokem bylo síťování získaných nanovláken pro zlepšení jejich hydrolytické stability a mechanických vlastností.

Chemické složení připravených nanovláken bylo studováno pomocí ATR-FTIR spektroskopie a EDX elementární analýzy, které potvrdily přítomnost oxidované soli v nanovlákněném materiálu. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byl určen průměr získaných nanovláken a jejich morfologie. Metodou chemické bioluminiscence byly prokázány baktericidní účinky, které ve většině případů vykazovaly téměř úplnou inhibici po celou dobu testování. Na připravených nanovlákněch byla také testována viabilita buněk.

Námi připravený materiál může mít potenciální využití v chirurgii, v regenerativní medicíně měkkých tkání (popáleniny), případně ve tkáňovém inženýrství.

Tato práce byla podpořena projekty Regionální VaV centrum pro nízkonákladové plazmové a nanotechnologické povrchové úpravy - CEPLANT (CZ.1.05/2.1.00/03.0086), projektem LO1411 (NPU I) a projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

## LITERATURA

- Švachová V., Jančář J., Vojtová L., Alberti M., Pavliňák D., Hyršl P.: Kompozice pro přípravu želatinových nanovláken a nanovláknina. Užitiný vzor U1 26 811, 17. 04 2014, Brno.

## SYNTEZA ORGANOKATALYZÁTORŮ ZALOŽENÝCH NA CYKLODEXTRINU

IVETA TICHÁ, JINDŘICH JINDŘICH

Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2  
iveta.ticha@natur.cuni.cz

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy tvořené z D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha(1\rightarrow4)$ -O-glykosidovou vazbou<sup>1</sup>. Vzhledem ke své schopnosti inkudovat sloučeniny do kavity umožňují provést chemické reakce se zvýšenou regioselektivitou a stereoselektivitou<sup>2</sup>.

Organokatalyzátory na bázi CD jsou perspektivními stavebními bloky pro přípravu umělých enzymů<sup>3</sup> a představují tedy vhodný skelet pro tvorbu tzv. trifunkčních organokatalyzátorů - analogů bifunkčních katalyzátorů<sup>4</sup>, kde třetí „funkci“ představuje kavita CD.

Vzhledem ke zmíněným vlastnostem CD jsme se zaměřili na syntézu nových derivátů CD **I**, **II** využitelných v asymetrických transformacích aldehydů. K  $\alpha$ -CD skeletu (schéma 1) bude připojena thioamocovinová funkční skupina (pro aktivaci elektrofilu) a terciární amin (pro aktivaci nukleofilu).

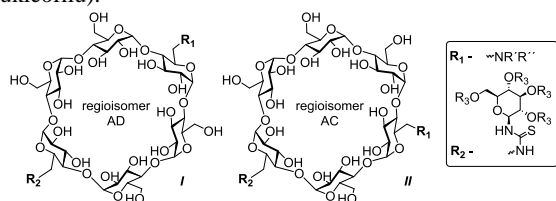


Schéma 1. Navržené trifunkční organokatalyzátory **I** a **II**

Pro přípravu<sup>5</sup> regiosomeru AD vycházíme z přípravy 6<sup>I</sup>-amino-6<sup>I</sup>-deoxy-6<sup>IV</sup>-hydroxy-perbenzyl- $\alpha$ -CD **III**, zatímco regiosomer AC z přípravy<sup>6</sup> 6<sup>I</sup>-azido-6<sup>I</sup>,6<sup>III</sup>-dideoxy-6<sup>III</sup>-O-mesitylen-sulfonyl- $\alpha$ -CD **IV** (schéma 2).

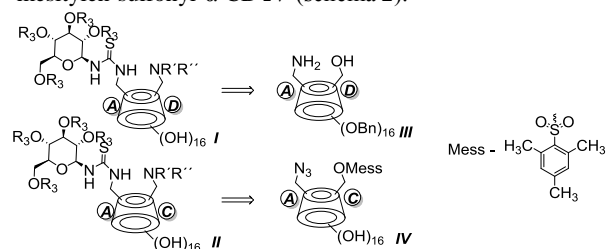


Schéma 2. Retrosyntetický přístup pro regiosomery AC a AD

### LITERATURA

1. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
2. Zhou Y., Pedersen M. C., Bols M.: Tetrahedron Lett. 54, 2458 (2013).
3. Breslow R.: Chem. Br. 19, 126 (1983).
4. Pihko P.: Angew. Chem. Int. Ed. 43, 2062 (2004).
5. Guieu S., Sollogoub, M.: Angew. Chem. Int. Ed. 47, 7060 (2008).
6. Dai Y., Wang S., Wu J., Tang, J., Tang, W.: RSC Adv. 2, 12652 (2012).

## MUTANTNÍ FORMY PROTEINU P53 MOHOU INTERAGOVAT S ALTERNATIVNÍMI SEKUNDÁRNÍMI STRUKTURAMI DNA

VLASTIMIL TICHÝ, LUCIE NAVRÁTILOVÁ,  
MARIE BRÁZDOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., 612 65 Brno  
vlastik@ibp.cz

Sequenčně specifická vazba k promotorům cílových genů standardní formy proteinu p53 (wtp53) je nezbytná pro jeho nádorově supresorovou funkci. Tento typ vazby k DNA, kterou zajišťuje centrální DNA-vazebná doména (DBD), je však u mutantní formy proteinu p53 (mutp53) z důvodu převážně bodových mutací v DBD inhibován<sup>1</sup>. Přesto byla pozorována u proteinů mutp53 schopnost regulace exprese cílových genů proteinu p53 (cit.<sup>2</sup>). Za strukturálně specifickou vazbu k DNA je u proteinu p53 zodpovědná především druhá DNA-vazebná doména (CTDBD) na C-konci proteinu, jejíž aktivita je také u proteinů mutp53 zachována. Při studiu strukturálně specifické vazby vykazovaly proteiny wtp53 i mutp53 preferenci k superhelikální plazmidové DNA<sup>3</sup>. Podobná preference byla pozorována také u plazmidové DNA obsahující přirozená cílová místa proteinu mutp53 R273H získaná chromatinovou imunoprecipitací (ChIP sekvence) z genomu buněk glioblastomové linie U251. Bioinformatická analýza odhalila u získaných ChIP sekvencí zvýšený obsah repetitivní DNA, která může díky vyšší negativní superhelicitě tvořit alternativní sekundární struktury DNA<sup>4</sup>.

Naše práce byla zaměřena na studium interakce proteinů wtp53 a vybraných mutp53 s alternativními strukturami DNA. Pro studium byly vybrány sekvence s prokázanou tvorbou křížové struktury a sekvence repetitivní DNA. V případě použití křížové struktury vykazoval protein wtp53 preferenční vazbu k DNA s vytvořenou alternativní strukturou oproti kontrolní DNA. V druhém případě byla zjištěna podobná vazebná preference proteinu wtp53 k repetitivní, a také specifické DNA obsahující konsenzní sekvenci p53CON, oproti nespecifické DNA. Proteiny mutp53 se však přednostně vázaly již pouze k repetitivní DNA oproti nespecifické nebo specifické DNA. V rámci provedených analýz bylo zjištěno, že nejen topologii DNA, ale také alternativní sekundární struktury DNA rozpoznává především C-koncová DNA-vazebná doména proteinu p53.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 13-36108S.

### LITERATURA

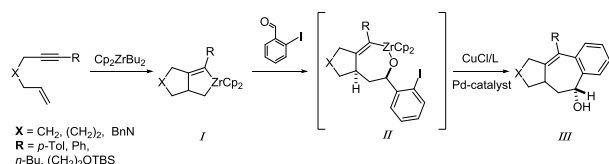
1. Gohler T., Jager S., Warnecke G., Yasuda H., Kim E., Deppert W.: Nucl. Acids Res. 33, 1087 (2005).
2. Quante T., Otto B., Brázdoval M., Kejnovská I., Deppert W., Tolstonog G.V.: Cell Cycle 11, 3290 (2012).
3. Brázdoval M., Navrátilová L., Tichý V., Němcová K., Lexa M., Hrška R., Pečinka P., Adámik M., Vojtesek B., Paleček E., Deppert W., Fojta M.: PLoS One 8, e59567 (2013).
4. Brázdoval M., Quante T., Toggel L., Walter K., Loscher C., Tichý V., Cincárová L., Deppert W., Tolstonog G.V.: Nucl. Acids Res. 37, 1486 (2009).

## A NEW Zr-BASED PATHWAY TO 5-7-6(Ar) RING SYSTEMS

**NIKOLA TOPOLOVČAN, ILLIA PANOV, MARTIN KOTORA**

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science,  
Charles University in Prague, 128 43 Prague  
nikola.topolovcan@natur.cuni.cz

Zirconacyclopentenes, prepared by coupling a low-valent zirconocene with unsaturated hydrocarbons<sup>1</sup>, can undergo an addition reaction to carbonyl group of various aldehydes<sup>2</sup>. It is also known that substituted zirconacyclopentadienes undergo a coupling reaction with aryl halides producing fused-ring compounds<sup>3,4</sup>. Combining the methods mentioned above, a study was undertaken on the reaction of bicyclic zirconacyclopentenes **I** with commercially available halo-substituted benzaldehydes to form tricyclic compounds **III** (Scheme 1).



Scheme 1. Formation of oxazirconacycloheptene **II** and subsequent coupling reaction

Due to its higher nucleophilicity, the C(sp<sup>3</sup>)-Zr bond in **I** undergoes a chemo- and stereoselective reaction with the carbonyl carbon of the aldehyde yielding the oxazirconacycloheptene intermediate **II**. The subsequent transmetalation of the remaining C(sp<sup>2</sup>)-Zr bond with CuCl and additives was followed by the intramolecular coupling reaction leading to the desired tricyclic product **III** in reasonable yields. The scope as well as mechanistic aspects of the reaction were studied in detail. Furthermore, the mechanism of the undesirable side-reaction occurring during the transmetalation was elucidated as well. This approach provides a simple and one-pot procedure for the synthesis of the fused 5-7-6(aryl) ring compounds with potential application as an advanced intermediates for the syntheses of more complex molecules featuring similar carbon skeletons.

### REFERENCE

1. Negishi E., Takahashi T.: *Aldrichimica Acta* 18, 31 (1985).
2. Copéret C., Negishi E., Xi Z., Takahashi T.: *Tetrahedron Lett.* 35, 695 (1994).
3. Takahashi T., Hara R., Nishihara Y., Kotora M.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5154 (1996).
4. Takahashi T., Sun W-H., Duan Z., Shen B.: *Org. Lett.* 2, 1197 (2000).

## PRESSOCUCURBIT[5]JURIL: SYNTÉZA A SUPRAMOLEKULÁRNÍ VLASTNOSTI

**LUKÁŠ USTRNUL<sup>a</sup>, PETR KULHÁNEK<sup>b</sup>, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Ústav chemie, Masarykova univerzita; Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, <sup>b</sup>CEITEC, 625 00 Brno  
lukasustrnul@mail.muni.cz

Cucurbit[n]urily jsou makrocyclické sloučeniny známé schopností vázat ve vodě vhodné organické i anorganické hosty s vysokou afinitou<sup>1</sup>. Nejmenší z nich se skládá z pěti glykolurilových jednotek a jeho asociační schopnosti jsou omezeny na malé molekuly rozpouštědel a plyny. Toto vázání bylo prokázáno v roztoku, i v pevné fázi<sup>2</sup>.

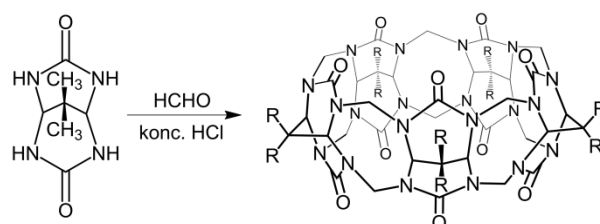


Schéma 1. Příprava Me<sub>10</sub>pressocucurbit[5]urilu z dimethylpropandimochoviny (2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nona-3,7-dion)

Ve svém příspěvku budu prezentovat syntézu a vlastnosti nového makrocycly (Me<sub>10</sub>prCB[5]), který je složen z pěti propandimochovinových jednotek. Látka má v porovnání s podobnými cucurbiturily menší vzdálenost mezi karbonylovými portály a vyšší rozpustnost ve vodě i dalších rozpouštědlech.

Pro srovnání supramolekulárních interakcí se strukturně blízkými CB[5] a Me<sub>10</sub>CB[5] jsme stanovili pro všechny zmíněné makrocycly asociační konstantu s methanem. V NMR jde o pomalou výměnu a chemický posun komplexovaného methanu je pro každý makrocycly odlišný, a proto jsme mohli výsledky ověřit kompetičním experimentem, který byl ve shodě s ostatními měřeními.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (13-15576S), MŠMT ČR (LM2011028 a LO1214), a projektu CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu pro regionální rozvoj.

### LITERATURA

1. Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabati S, Isaacs L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4844 (2005).
2. Miyahara Y., Abe K., Inazu T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 3020 (2002).

### CLP-X INTERFERES WITH MSR(A)-MEDIATED KETOLIDE RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

VLADIMIR VIMBERG, JAKUB LENART, JIRI JANATA, GABRIELA BALIKOVA-NOVOTNA\*

Institute of Microbiology, AS CR, 142 20 Prague  
vladimir.vimberg@biomed.cas.cz

Macrolides are important antibiotics used in clinical practice to treat infections caused by *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup>. The ABCF family protein Msr(A) confers high resistance in staphylococci to macrolides but only low resistance to ketolides, the newest class of macrolides<sup>2</sup>.

To examine the possibility of the development of ketolide resistance as a result of changes in Msr(A) specificity, we selected and analyzed mutants of *S. aureus*, resistant to ketolide antibiotic – telithromycin, in which the resistance entirely depended on *msr(A)* expression. Unexpectedly, selected mutants had no mutations in the *msr(A)* gene. Genome resequencing of one mutant revealed single amino acid substitution in ClpX, substrate-recognizing component of the ClpXP proteolytic system, which regulates protein quality and turnover through controlled proteolysis<sup>3</sup>.

Mutations in ClpX were detected in all mutants and were in conserved functional regions of the protein. Deletion of *clpX* significantly increased Msr(A)-mediated resistance to the telithromycin, but no changes in resistance were observed in a *clpP*-knockout strain expressing *msr(A)*, demonstrating that ClpX affects Msr(A) independently of ClpP. It has been shown that the ClpP-independent activity of ClpX plays a role in destabilization of protein-DNA and protein-protein complexes<sup>4</sup>.

Considering two hypotheses of Msr(A) function, ClpX may destabilize the interaction of Msr(A) with a membrane protein that assists in Msr(A) mediated antibiotic efflux or it may destabilize the interaction of Msr(A) with a ribosome thereby interfering with displacement of an antibiotic from the ribosome<sup>5</sup>.

#### REFERENCE

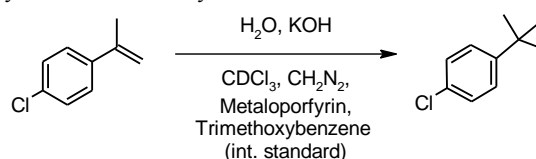
1. Adriaenssens N., Coenen S., Versporten A., Muller A., Minalu G., Faes C., Vankerckhoven V., Aerts M., Hens N., Molenberghs G.: J. Antimicrob. Chemother. 66 Suppl 6, vi3–12, (1997).
2. Reynolds E.D., Cove J.H.: J. Antimicrob. Chemother. 56, 1179 (2005).
3. Glynn S.E., Martin A., Nager A.R., Baker T.A., Sauer R.T.: Cell 139, 744 (2009).
4. Burton B.M., Williams T.L., Baker T.: Mol. Cell 8, 449 (2001).
5. Kerr I.D., Reynolds E.D., Cove J.H.: Biochem. Soc. Trans. 33, 1000 (2005).

### POLYAROMATICKÉ DENDRIMERY S METALOPORFYRINEM V CENTRU JAKO RECYKLOVATELNÉ KATALYZÁTORY CYKLOPROPANAČNÍ REAKCE

PETR VINŠ<sup>a,b</sup>, KATEŘINA NOVÁKOVÁ<sup>c</sup>, JOSEF CVAČKA<sup>c</sup>, PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>, FERNANDO COSSÍO<sup>b</sup>

<sup>a</sup>VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>UPV/EHU, Manuel de Lardozabal Avenue 3, 20018 San Sebastián-Donostia, Spain; <sup>c</sup>IOCB AS CR, 166 10 Praha 6  
petr.vins@vscht.cz

Polyaromatické dendrimery Fréchetova typu<sup>1</sup> s *tetrakis*(4'-hydroxyfenyl)porfyrinem, coby jádrem molekuly, byly připraveny konvergentní metodou a následně převedeny na komplex<sup>2</sup> s Fe<sup>III</sup>. Sada těchto sloučenin počínající jednoduchými metaloporfyriny až po nové dendrimery 2. až 4. generace byla porovnána co do katalytických vlastností během cyklopropanační reakce mezi derivátem styrenu a diazomethanem. Tato reakce probíhala dle metody<sup>3</sup> založené na kontinuálním přidávku derivátu diazaldy, prekursoru diazomethanu, který byl postupně generován *in situ* v zásaditém vodném prostředí dvojfázové reakční směsi, zatímco v organické fázi docházelo k rychlé katalyzované reakci se styrenem.



Byly porovnány konverzní křivky cyklopropanace za použití připravených katalyzátorů oproti teoretickému ideálnímu průběhu reakce a ověřena možnost opakovaného použití metaloporfyrinů po izolaci z reakční směsi.

Získaná data nabízejí představu o možnostech a omezeních použití těchto dendrimerních katalyzátorů<sup>4</sup>, a také o detailech průběhu reakce s diazomethanem v málo obvyklém, ale technologicky zajímavém dvoufázovém uspořádání.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR č. MSM6046137305, GAČR č. 304/10/1951 a P503/11/0616, a stipendijní podpory DIPIC.

#### LITERATURA

1. Hawker C.J., Fréchet J.M.J.: J. Am. Chem. Soc. 112, 7638 (1990).
2. Shema-Mizrachi M., Pavan G. M., Levin E., Danani A., Lemcoff N. G.: J. Am. Chem. Soc. 133, 14359 (2011).
3. Morandi B., Carreira E.M.: Science 335, 1471 (2012).
4. Astruc D., Chardac F.: Chemical Reviews 101, 2991 (2001).

### APPLICATION OF ALIGNMENT MEDIA IN STRUCTURAL ANALYSIS OF CALIX[4]ARENE DERIVATIVES

**LUKÁŠ VRZAL<sup>a</sup>, KAROLÍNA FLÍDROVÁ<sup>b</sup>, JAN HOLUB<sup>b</sup>, PAVEL LHOTÁK<sup>b</sup>, HANA DVOŘÁKOVÁ<sup>a</sup>**

*University of Chemistry and Technology, Prague, <sup>a</sup>Lab. of NMR Spectroscopy, <sup>b</sup>Dept. of Organic Chemistry, Technická 5, 166 28 Prague  
lukas.vrzal@vscht.cz*

The aim of this work is the application of residual dipolar coupling constants (RDCs)<sup>1</sup> measurement method in conformational behavior study of new inherently chiral calix[4]arene derivatives. RDC is an anisotropic direct through space dipole-dipole interaction, which is result of partial alignment of the compound in external magnetic field, and includes information about spatial arrangement of molecule.

The study was started with the testing of the series of recently published liquid crystalline alignment media based on polyglutamates and polyacetylenes on the model dipropoxycalix[4]arene with respect to the ease of the preparation and the degree of the introduced alignment. Suitable alignment media were used to determine or specify the spatial structure of three types of new inherently chiral calix[4]arene derivatives, whose structures could not be determined by standard NMR methods (NOE, J-interactions).

Using the method of RDC measurement we established that the phenoxanthiin derivative<sup>2</sup> occurs in 1,2-alternate conformation (Fig. 1A) while dinitroso-derivative adopts

pinched cone conformation with nitroso groups on declined (flattened) aromatic rings (Fig. 1B). In case of 2-pyridylsulfoxide calix[4]arene with intramolecularly bridged meta positions<sup>3</sup> we succeeded to specify the X-RAY structure (Fig. 1C).

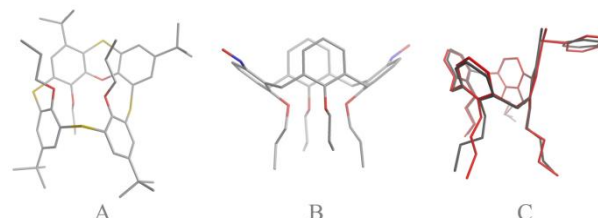


Fig. 1. Structure of three types of new inherently chiral calix[4]arene derivatives obtained by the RDC measurement method. X-RAY structure is shown of Fig. C in gray

*This research was supported by the Czech Science Foundation (P207/12/2027).*

#### REFERENCE

1. Thiele C. M.: Concepts Magn. Reson., Part A, 30A, 65 (2007).
2. Vrzal L., Flídrová K., Tobrman T., Dvořáková H., Lhoták P.: Chem. Commun. 50, 7590 (2014).
3. Holub J., Eigner V., Vrzal L., Dvořáková H., Lhoták P.: Chem. Commun. 49, 2798 (2013).



SIGMA-ALDRICH



Chemické listy



Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu  
Člen IUBMB a FEBS





## REJSTŘÍK AUTORŮ

Adámik, Matej	5, 32	Hřebabecký, Hubert	34	Lepcio, Petr	24
Aragon, Virginia	35	Hubálková, Pavla	10	Lhoták, Pavel	42
Armstrong, Lyle	5	Hudská, Klára	38	Lindner, Wolfgang	19
Bábková, Zuzana	32	Hulcová, Daniela	13	Lipov, Jan	13
Baldovič, Marián	37	Hynek, Jan	12	Lipovská, Pavlín	25
Balík, Aleš	23	Hyršl, Pavel	38	Lišková, Petra	9
Balíková-Novotná, Gabriela	41	Chaloupková, Radka	25	Lišková, Veronika	25
Bárta, Tomáš	5, 30	Chamradová, Ivana	13, 33	Ločárek, Miroslav	13
Bažantová, Pavla	5	Charpentier, Julie	26	Lochman, Jan	15
Beck, Inken	22	Chawengsaksophak, Kallayane	22	Luhová, Lenka	15, 23
Bednářová, Lucie	15	Chlebek, Jakub	13	Lukas, Cajanek	7
Bednář, David	25	Chmelík, Josef	33	Macáková, Kateřina	13
Beier, Petr	26	Chodounská, Hana	17	Man, Petr	16, 17, 20, 35
Belán, Ondřej	6	Chromčáková, Žaneta	27	Mandíková, Jana	26
Blahoš, Jaroslav	10	Jablonská, Eva	13	Martinek, Václav	35
Blahovcová, Eva	6	Jakl, Michal	14	Martínková, Markéta	35
Bognár, Csaba	37	Jaklová Dyrtrtová, Jana	14	Matoušek, Václav	26
Boušová, Kristýna	15	Janata, Jiri	41	Miklík, Dalibor	27
Brázdová, Marie	5, 32, 39	Jančář, Josef	6, 13, 24, 33, 38	Mlčochová, Hana	16
Brezovský, Jan	25	Ječmen, Tomáš	14	Mlčochová, S.	33
Bubnov, Alexej	32	Ječná, Michaela	36	Murín, Radovan	6
Budínská, Alena	26	Jendřišáková, Tereza	15	Natšínová, Marta	26
Bumba, Ladislav	15	Jindřich, Jindřich	39	Navrátil, Tomáš	14
Bystřický, Zdeněk	6	Jirásková, Lucie	28	Navrátilová, Lucie	26, 39
Cajánek, Lukas	7	Jirát Matějčková, Jitka	11	Navrkalová, Veronika	28
Cahlíková, Lucie	13	Jirků, Michaela	15	Nencka, Radim	34
Cebecauer, Marek	29	Jirsová, Kateřina	9	Neumanová, Zuzana	28
Cossío, Fernando	41	Joska, Luděk	13	Nigg Erich	7
Crliková, Z.	33	Juráček, Jaroslav	16	Nováček, Jiří	16
Cvačka, Josef	41	Jurtíková, Veronika	22	Novák, Petr	14, 17, 33
Cwiklik, Lukasz	29	Kacifová, Miroslava	16	Novák, Zdeněk	13
Čečková, Martina	8, 28	Kádasi, Ludevit	37	Nováková, Kateřina	41
Černohorská, Halina	10	Kádek, Alan	16, 17	Novotná, Pavlína	13
Černý, Jiří	23	Kárová, Kristýna	17	Novotná, Vladimíra	32
Červený, Lukáš	28	Kašparovský, Tomáš	15	Nůsková, Hana	22
Čihalová, Daniela	8	Kavan, Daniel	33	Obalová, Lucie	27
Dalby, Matthew J.	13	Klema, Jiří	9	Obšil, Tomáš	16
Damborský, Jiří	25	Kletečková, Lenka	17	Obšilová, Veronika	16, 20
Danihlík, Jiří	8	Kmínková, Jana	28	Olišinová, Marie	29
Demel, Jan	12	Knejzlík, Zdeněk	36	Ondryášová, Hana	29
Dobrota, Dušan	6	Knopfová, Lucia	30	Opletal, Lubomír	13
Doležalová, Dáša	9	Kočí, Zuzana	18	Pacherník, Jiří	24
Drábek, J.	33	Kohout, Michal	19, 32	Panáček, Aleš	35
Drábek, Jiří	29	Kolaříková, Viola	19	Panov, Illia	40
Dračínský, Martin	34	Koledová, Zuzana	20	Pávek, Petr	26
Dráfi, František	22	Kopecká, Miroslava	20	Pavliňák, David	38
Drašar, Pavel	41	Kopečný, David	23	Pečinka, Petr	5
Đudáková, Lubica	9	Kostov, Ondřej	21	Pekarčíková, Lucie	30
Dvořáková, Hana	42	Kotora, Martin	21, 40	Peltanová, Barbora	16
Dvořáková, Michaela	10	Koudeláková, Táňa	25	Pešková, Lucie	5, 30
Elleder, Daniel	12	Koudeláková, V.	33	Petrůj, Jaroslav	31
Erich, Nigg	6	Koudeláková, Vladimíra	29	Petruš, Josef	31
Ešner, Milan	22	Koukal, Petr	21	Petřivalský, Marek	8, 15, 23
Ettrich, Rudiger	17	Kovalčíková, Jana	22	Pietrasiak, Ewa	26
Fábryová, Helena	12	Kraimer, Michael	22	Piša, Ondřej	31
Flidrová, Karolína	42	Krásný, Libor	11	Polášková, Alena	5, 32
Fojt, Jaroslav	13	Kratochvilová, Kateřina	22	Poryvai, Anna	32
Fojtíková, Veronika	35	Kratošová, Gabriela	27	Pospíšilová, Eliška	33
Forostyak, Serhiy	18	Krejčí, Lumír	6	Pospíšilová, Šárka	28
Franková, Daniela	10	Krůšek, Jan	23	Poštulková, Hana	33
Fröhlich, Jan	10	Křížová, Edita	36	Potočková, Jana	33
Grygárková, I.	33	Kubát, Pavel	12	Prezeau, Laurent	10
Hajdúch, Marián	29, 33	Kubičková, Svatana	10	Procházková, Eliška	34
Hájek, Peter	26	Kubienová, Lucie	23	Prudníková, Tatyana	25
Hájková, Alena	10	Kubínová, Šárka	18	Ptáčková, Renata	14
Halada, Petr	11	Kubová, Hana	17	Račay, Peter	6
HAMPL, Aleš	9, 20, 22, 30	Kučera, František	31	Rádl, Stanislav	31
Hatok, Jozef	6	Kudová, Eva	17	Rambousek, Lukáš	17
Hejnar, Jiří	26	Kukačka, Zdeněk	17, 20, 33	Rathouský, Jiří	12
Helma, Robert	32	Kulhánek, Petr	40	Rosenberg, Ivan	21
Hnilicová, Jarmila	11	Kuneš, Jiří	13	Rosůlek, Michal	17
Hodek, Petr	14	Kutá Smatanová, Ivana	25	Rubeš, Jiří	10
Hof, Martin	29	Kvičala, Jaroslav	11, 19, 25, 37	Ruml, Tomáš	13, 36
Holub, Jan	42	Kvítek, Libor	35	Rybáčková, Markéta	11, 25, 37
Horak, Peter	22	Ladislav, Marek	23	Řezáčová, Pavlína	25
Hošek, Jan	11, 25	Lako, Majlinda	5	Sátková, Pavla	15
Hošťálková, Anna	13	Lang, Kamil	12	Sedláček, Radislav	22
Houštěk, Josef	22	Lánová, Martina	24	Sedmera, David	22
Hozák, Pavel	22	Lenart, Jakub	41	Shimizu, Toru	35
Hron, Tomáš	12	Lenobel, René	8	Schröfel, Adam	27

Slabý, Ondřej	16	Štaud, František	8, 28	Věnsková, Veronika	29
Slavkovský, Rastislav	29	Šulc, Miroslav	14	Vimberg, Vladimír	41
Smékalová, Monika	35	Švachová, Veronika	38	Vinarský, Vladimír	30
Souček, Karel	22	Techlovská, Šárka	10	Vinš, Petr	41
Stráňava, Martin	35	Teisinger, Jan	15	Vojtová, Lucy	13, 33, 38
Stránská, J.	33	Tichá, Iveta	39	Volková, Marie	26
Strnadová, Lenka	36	Tichá, Tereza	23	Vondráková, Kateřina	17
Svoboda, Jiří	32	Tichý, Vlastimil	39	Vondrášek, Jiří	15
Svoboda, Petr	36	Togni, Antonio	26	Vozdová, Miluše	10
Šyková, Eva	18	Topolovec, Nikola	40	Vrbický, Marek	22
Šafratová, Marcela	13	Trbušek, Martin	28	Vrbková, J.	33
Šebejová, Ludmila	28	Trejtner, František	25	Vrzal, Lukáš	42
Šebela, Marek	8	Trojaneč, R.	33	Výborný, Karel	18
Šebest, Lukáš	37	Tsenov, Grygoriy	17	Vyklický Jr., Ladislav	17
Šebestová, Eva	25	Tsimbouri, Penelope M.	13	Vyklický, Ladislav	23
Šebestová, Hana	10	Tukmachev, Dmitry	17	Wolrab, Denise	19
Šenič, Filip	26	Urbanová, Marie	13	Zbořil, Radek	35
Šigutová, Kamila	36	Ustrnul, Lukáš	40	Zemanová, Jana	28
Šiková, Michaela	11	Václavík, Jiří	26	Zídek, Václav	36
Šimůnek, Ondřej	37	Vahala, Jiří	10	Zidková, Jarmila	36
Šindelář, Vladimír	40	Valeš, Karel	17		
Školová, Barbora	38	Vaňhara, Petr	22		
Škop, Vojtěch	36	Vávra, Ivo	27		
Šmarda, Jan	30	Vávrová, Kateřina	38		
Špirek, Mário	6	Večeřa, Josef	24		



**CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 13 (2015), čís./no. 1 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • evidenci číslo MK ČR E 21999 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: P. Chuchvalec • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, P. Holý, J. Horák, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Podešva, P. Rauch; Webové stránky: P. Zámstný • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • Redakce čísla (ISSUE EDITOR) P. Drašar, M. Fusek • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.ccsss.cz> • TISK: Garamon s.r.o., Wonkova 432, 500 02 Hradec Králové • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2015 Czech Chemical Society Symposium Series/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč • Pokyny pro autory najdete na <http://www.ccsss.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Molekulární námět na obálce: Vladimír Palivec • Dáno do tisku 14.4.2015.**