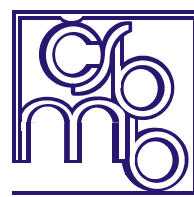




MERCK

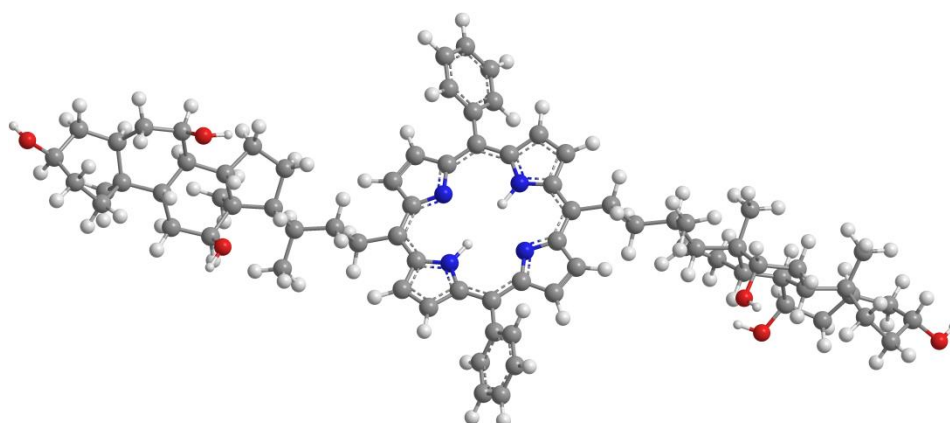


SIGMA-ALDRICH®

Chemické listy



Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu
Člen IUBMB a FEBS



XVI MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ
MLADÝCH BIOLOGŮ,
BIOCHEMIKŮ
A CHEMIKŮ

10. 5. – 13. 5. 2016

hotel Devět Skal Milovy

sborník redigovali
Radmila Řápková, Martin Fusek, Pavel Drašar



Organizátoři konference vyslovují vřelé poděkování za podporu



IDENTIFIKACE ENZYMU DHRS1 JAKO SPECIFICKÉHO MOLEKULÁRNÍHO CÍLE PROTINÁDOROVÉHO LÉČIVA ORACINU

RUDOLF ANDRÝS^a, LUCIE ZEMANOVÁ^a, JURAJ LENČO^a, VLADIMÍR WSÓL^a

*Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
andrýsr@faf.cuni.cz*

Metody chemické proteomiky, založené na specifické interakci mezi bioaktivní látkou a cílovou molekulou, patří v současné době k nejpoužívanějším technikám při identifikaci molekulárních cílů bioaktivních látek¹. Karbonyl-redukující enzymy představují fyziologicky důležitou skupinu proteinů, jelikož se jedná o časté molekulární cíle řady endogenních (např. prostaglandiny, steroidní hormony) i xenobiotických (např. antracykliny, oracin) sloučenin. I když je většina dosud charakterizovaných karbonyl-redukujících enzymů cytosolických, v nadrovině dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) se nachází i řada membránově vázaných zástupců. Znalosti o jejich podílu na metabolismu xenobiotik ale zatím nejsou příliš velké. Výzkumem stereospecifity redukce potenciálního protinádorového léčiva oracinu však byla zjištěna účast dalších, dosud nepopsaných mikrosomálních karbonyl-redukujících enzymů na jeho metabolismu. Dosavadní pokusy o jejich purifikaci a charakterizaci ovšem skončily nezdarem².

Cílem tohoto projektu bylo vytvoření originálního afinitního nosiče s ligandem oracinem, schopného selektivně izolovat karbonyl-redukující enzymy z lidské jaterní tkáně a u těchto enzymů následně potvrdit jejich možnou roli v biotransformaci³. Byly tak izolovány a identifikovány enzymy DHRS1, RDH16 a 17β-HSD6 s dosud neznámou afinitou a metabolickou aktivitou vůči oracinu a dále enzym 11β-HSD1, u kterého byla afinita vůči oracinu popsána již dříve. U vybraného enzymu DHRS1 byla specifita interakce s léčivem oracinem následně potvrzena u rekombinantně připravené formy jeho inkubací s afinitním nosičem a dále pomocí metody Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS). Potvrzení specifické interakce enzymu DHRS1 s tímto xenobiotickým substrátem může naznačovat jeho další potenciální roli v biotransformaci jiných xenobiotik.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury UK 926212/V/2013, Univerzity Karlovy (SVV 260 186).

LITERATURA

1. Ziegler S., Pries V., Hedberg C., Waldmann H.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 2744 (2013).
2. Škarydová L., Skarka A., Novotná R., Živná L., Martin H.-J., Wsól V.: *Toxicology* 264, 52 (2009).
3. Škarydová L., Andrýs R., Holubová L., Štambergová H., Kňavová J., Wsól V., Bílková Z.: *J. Sep. Sci.* 36, 1176 (2013).

MODIFIKACE KOLAGENOVÝCH SCAFFOLDŮ BIOLOGICKY AKTIVNÍMI LÁTKAMI

JOHANA BABRNÁKOVÁ

*VUT v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a materiálů, Purkyňova 118, Královo Pole, 612 00 Brno
xcbabrnakova@fch.vutbr.cz*

Kolagen jako biomateriál pro tkáňové inženýrství je již dlouho studován pro jeho unikátní biologické a mechanické vlastnosti podobné extracelulární matrix. Vytvořením 3D porézní struktury je možno jej použít jako scaffold, který je schopen nahrazovat měkké tkáně. Mnohé výzkumy směřují k úpravě těchto scaffoldů pomocí syntetických biodegradabilních polymerů. Výsledný scaffold tak vykazuje vhodné mechanické vlastnosti, stabilitu a také určitou biokompatibilitu potřebné pro regeneraci poškozené tkáně. Avšak nutná bioaktivita, která dosud nebyla příliš diskutována, se nyní dostává do popředí.

Dodáním biologicky aktivních látek je schopen scaffold poskytnout nejen oporu a prostředí pro růst buněk nové tkáně, ale také tento růst podpořit a urychlit. Aktivitou se rozumí začlenění látky aditiva do metabolického procesu buněk. Látky, které byly pro modifikaci kolagenových scaffoldů vybrány jsou oxidovaná celulóza, chitosan a komplex tří sacharidů. Jedná se o biopolymery, jež jsou získány z biologických zdrojů a vykazují biologickou aktivitu.

V této práci se pojednává o vlivu konkrétních biologicky aktivních látek na vlastnosti 3D porézních kolagenových scaffoldů a jejich bioaktivitu v tkáních živých organismů.

Tato práce vznikla za podpory Centra materiálového výzkumu a vedení doc. Ing. Lucy Vojtové, Ph.D.

FIREPROT: DESIGN TERMOSTABILNÍCH PROTEINŮ

DAVID BEDNÁŘ^{a,b}, KOEN BEERENS^a, EVA ŠEBESTOVÁ^a, JAROSLAV BENDL^{a,b}, RADKA CHALOUPKOVÁ^a, ZBYNĚK PROKOP^{a,b}, JAN BREZOVSKÝ^{a,b}, JIŘÍ DAMBORSKÝ^{a,b}

*^aLoschmidovy Laboratoře, Ústav Experimentální biologie a Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí RECETOX, Masarykova Univerzita, Kamenice 5/A13, 625 00 Brno,
^bMezinárodní centrum klinického výzkumu ICRC, Fakultní nemocnice u svatě Anny, Pekařská 53, 656 91 Brno
dave.bednar@tiscali.cz*

Stabilita je důležitou vlastností, která je nezbytná pro efektivní využití enzymů pro katalýzu, medicínu, diagnostiku nebo tvorbu nanomateriálů. Ve srovnání s náročnými experimentálními technikami, výpočetní metody představují levnou a rychlou alternativu vedoucí k zvýšení stability proteinů. Jednotlivé nástroje pro predikci stability však nemají vysokou spolehlivost, což spolu s častým výskytem antagonistických efektů mezi jednotlivými substitucemi může vést k chybám při jejich kombinaci. Proto jsou většinou *in*

silico predikovány pouze jednobodové mutace, které je třeba experimentálně otestovat, než se skombinují do finálních mutantů.

FireProt je výpočetní metoda, která kombinuje energetický a evoluční přístup pro predikci vysoce stabilních mnohonásobných mutantů. Účinnost metody byla prvně testována na 656 mutacích z 10 proteinů a poté aplikována na tři modelové proteiny. Jako modelové příklady ilustrující široké uplatnění metody FireProt byly vybrány následující proteiny z různých rodin a strukturních tříd: lidský fibroblastový růstový faktor FGF2, halogenalkandehalogenasa DhaA a γ -hexachlorocyclohexan dehydrochlorinasa LinA.

U všech proteinů došlo k významnému zlepšení termostability ($\Delta T_m = 20^\circ\text{C}$, 24°C a 21°C). Metoda FireProt tedy přináší významné zvýšení stability proteinů při minimální potřebě experimentálního testování. Metoda FireProt je potenciálně aplikovatelná na všechny proteiny se známou terciální strukturou a s dostatkem homologních sekvencí.

BIOPRODUKCE, APLIKACE A SLEDOVÁNÍ DEGRADAČNÍCH PROCESŮ VYBRANÝCH BIOPOLYMERŮ

PAVLA BENEŠOVÁ, STANISLAV OBRUČA, DAN KUČERA, IVANA MÁROVÁ

*Vysoké učení technické v Brně, FCH, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Průmyslová 118, 61200 Brno
xcbenesova2@fch.vutbr.cz*

Biopolymery jsou považovány za ekologicky přijatelné alternativy k materiálům pocházejícím z petrochemického průmyslu a to především díky jejich schopnosti podléhat přirozenému rozkladu a možnosti produkce z obnovitelných zdrojů. Nejvýznamnější skupinu představují mikrobiálně produkované biopolymery. Jedna ze zásadních výhod mikrobiálních polymerů je, že k produkci mohou být využity odpadní materiály pocházející zejména z agroindustriálních zdrojů.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), známé také jako „bakteriální plasty“, představují nejvýznamnější skupinu mikrobiálních biopolymerů. Značná výhoda polyhydroxyalkanoátů je v možnosti produkce s využitím odpadních materiálů, jež mohou sloužit jako zdroj uhlíku. Biopolymery nacházejí uplatnění především v oblasti lékařských aplikací, díky vhodným vlastnostem – biokompatibilitě a snadnému zpracování. Vedle již výše zmíněné biokompatibility je další velice významnou vlastností většiny biopolymerů schopnost podléhat biodegradaci. K tomuto procesu dochází působením mikroorganismů nacházejících se v přirozeném prostředí. Rychlost rozkladu se odvíjí od podmínek nacházejících se v okolním prostředí¹.

Cílem této práce je biotechnologická produkce, aplikace a charakterizace vybraných biopolymerů. Za účelem biotechnologické produkce vybraných polyesterů (polyhydroxyalkanoáty, polymer kyseliny jablečné) a polysacharidu (pullulan), byla testována řada odpadních materiálů jako vhodný zdroj uhlíku. Testovány byly především různé lignocelulosevé materiály, kávový odpad, nebo odpadní oleje. K produkci PHA

bylo využito několik bakteriálních kmenů (*C. necator*, *H. mediterranei*, *B. cepacia*, *B. megaterium*), pullulan a polymer kyseliny jablečné byl produkován polymorfní mikroorganismem *A. pullulans*. Další experimenty byly věnovány možným aplikacím vybraných mikrobiálních biopolymerů a to především přípravě nano(mikro)vláken, filmů a částic. U vybraných aplikačních forem biopolymerů byla testována biodegradovatelnost s využitím standardního kompostovacího testu IS/ISO 20/200. K degradaci jednotlivých materiálů bylo také využito vybraných mikrobiálních kmenů, u kterých byla sledována produkce depolymeras.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury České republiky GP15-206455.

LITERATURA

1. Lee W., Loo Ch., Nomura T., Sudesh K.: *Bioresour. Technol.* 99, 6844 (2008).

VLIV PROLIFERACE NA CITLIVOST K BUNĚČNÉ SMRTI V DŮSLEDKU INHIBICE ELEKTRON TRANSPORTNÍHO ŘETĚZCE

JAN BLECHA^{a,b}, JIŘÍ NEUŽIL^{b,c}, JAKUB ROHLENA^a

*^aBiotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 595, 25242 Vestec; ^bPřírodovědecká fakulta univerzity Karlovy v Praze, Albertov 2038/6, 128 00 Praha 2; ^cSchool of Medical Science, Griffith University, Southport, Qld, Austrálie
blecha.jan@ibt.cas.cz*

Multiproteinové komplexy mitochondriálního elektron-transportního řetězce (ETC) jsou zdrojem ATP a zároveň hlavními producenty reaktivních forem kyslíku (ROS). Dříve jsme ukázali, že MitoVES, inhibitor respiračního komplexu II, potlačuje nádorovou angiogenezi selektivní eliminací proliferujících endoteliálních buněk (EB). To naznačuje, že rozdíly v ETC proliferujících a klidových buněk by mohly mít významnou roli v citlivosti k buněčné smrti.

Buněčná smrt po inhibici ETC může nastat v důsledku zvýšené tvorby ROS či vyčerpání ATP. Abychom objasnili efekt inhibice ETC v proliferujících a klidových buňkách, pěstovali jsme EB v podmínkách stimulujících (LG, 1 g/l glukosy) a potlačujících (HG, 4,5 g/L glukosy) aktivitu ETC a vystavili je působení činidel zvyšující hladinu ROS nezávisle na ETC (PEITC, H₂O₂), inhibitorům ETC (Rotenon, MitoVES, Antimycin A, Piericidin) a inhibitoru ATP synthasy oligomycinu.

Ukazujeme, že proliferující EB jsou bez ohledu na kultivační podmínky citlivější k buněčné smrti vyvolané oxidačními činidly, které neovlivňují ETC. Inhibitory ETC působí efektivněji v proliferujících EB v podmínkách HG, ale v konfluentních buňkách v LG. Zvýšená produkce ROS koreluje s vyšší mírou buněčné smrti pouze v HG podmínkách.

Data naznačují, že interakce činidel s ETC a snížení produkce ATP je nejdůležitějším faktorem v indukci buněčné smrti v LG, zatímco v HG je buněčná smrt iniciována vyšší hladinou ROS. Hypotézu potvrzují experimenty s inhibitorem

ATP synthasy oligomycinem, který je výrazně efektivnější v konfluentních buňkách pěstovaných v LG. Expres i enzymatická aktivita komponentů antioxidační ochrany buňky (SOD2, Trx2, Prx3) v buňkách konfluentních bez ohledu na kultivační podmínky. To opět naznačuje, že nadprodukce ROS je rozhodujícím faktorem pro indukci buněčné smrti v proliferujících HG buňkách, zatímco deficit ATP je dominantní faktor v klidových buňkách v LG. Tuto interpretaci potvrzuje funkční eliminace SOD2, která má za následek zvýšení citlivosti konfluentních HG buněk k buněčné smrti způsobené inhibicí ETC.

Výzkum je podpořen granty GAUK 98215, GAČR 16-22823S a BIOCEV European Regional Development Fund CZ.1.05/1.1.00/02.0109.

NO₂ SENSOR WITH A GRAPHITE NANOPOWDER WORKING ELECTRODE

VÁCLAV BLECHTA^{a,b}, MARTIN MERGL^a,
KAROLINA DROGOWSKA^a, VÁCLAV VALEŠ^a,
MARTIN KALBÁČ^{a,b}

^aJ. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the ASCR, v. v. i., 182 23 Prague 8; ^bDepartment of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, 771 46 Olomouc

vaclav.blechta@jh-inst.cas.cz, karolina.drogowska@jh-inst.cas.cz, vaclav.vales@jh-inst.cas.cz, martin.kalbac@jh-inst.cas.cz

Cheap ultrahigh sensitivity sensors find many applications, hence their development is highly desirable. Here, we report a novel amperometric gas sensor based on the system graphene-ionic liquid-graphite nanopowder that we constructed. Prepared device exhibits response of 90 % towards 2 ppm of NO₂ in synthetic air and 40 % of relative humidity at room temperature. Short response time of 40 s and recovery time of less than one minute was observed. The variation of the saturation current with the concentration of the analysed gas shows a linear dependence in the range 1–5 ppm with a slope for the calibration curve of 0.2 μA/ppm. Furthermore, the device exhibited long term stability and can be operated even after more than one year with no significant change in its performance.

Our results thus show that graphite nanopowder can be efficiently used in sensing applications.

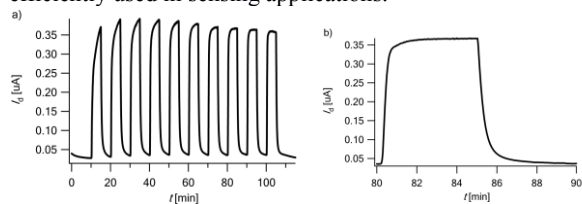


Figure 6: (a) Response of the prepared device to 10 cycles of 2 ppm of NO₂. (b) Detail of the eighth cycle.

CYTOTOXICKÁ AKTIVITA TRITERPENŮ SUBSTITUOVANÝCH V POZICI 2

LUCIE BORKOVÁ^a, JAN ŠAREK^b, JIŘÍ ŘEHULKA^b,
PETR DŽUBÁK^b, MARIÁN HAJDÚCH^b, MILAN
URBAN^{a,b}

^aKatedra organické chemie, PřF, Univerzita Palackého, Tř. 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc; ^bÚstav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
borkova@orgchem.upol.cz

Cílem této práce bylo připravit sérii 2-substituovaných derivátů lupanu a 18 α -oleananu a prozkoumat jejich cytotoxickou aktivitu. Je známo několik derivátů lupanu s vysokou cytotoxickou aktivitou obsahujících elektronegativní substituent v pozici 2 (např. **I** nebo **II**, když R=OH)¹. Zdá se, že jejich cytotoxicita je řízena elektronegativitou substituentu. Za účelem potvrzení nebo vyvrácení této teorie byla nasynthetizována menší knihovna triterpenoidů modifikovaných v pozici 2.

Nejprve byl připraven set difluorovaných derivátů jako příklad nejvíce elektronegativních substituentů². Následně jsme do výchozí molekuly zavedli řadu elektron akceptorních skupin (jako jsou R=NO₂, NH₂, CN, SH, aj.), převážně nukleofilní substitucí bromketonu **I**. Výsledky biologického testování a vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou budou diskutovány.

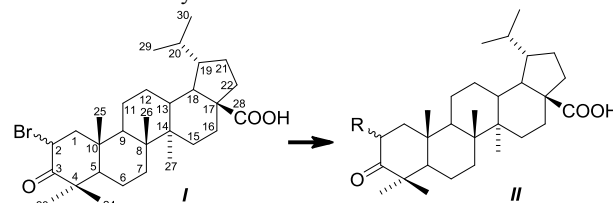


Schéma 1. Lupanové deriváty s elektron akceptorními skupinami

Tato práce vznikla za podpory GACR (15-05620S) a vnitřního grantu Univerzity Palackého (IGA_PrF_2015_00).

LITERATURA

- Urban M., Vlk M., Dzubak P., Hajduch M., Sarek J.: Bioorg. Med. Chem. 20, 3666 (2012).
- Borkova L., Jasikova L., Rehulka J., Frisonsova K., Urban M., Frydrych I., Popa I., Hajduch M., Dickinson N. J., Vlk M., Dzubak P., Sarek J.: Eur. J. Med. Chem. 96, 482 (2015).

ORTHOAGONÁLNĚ CHRÁNĚNÝ NITROTYROSIN JAKO VHODNÝ STAVEBNÍ BLOK PRO *IN VITRO* SYNTÉZU PROTEINŮ VZNIKAJÍCÍCH OXIDATIVNÍM STRESEM

**EVA BRICHTOVÁ, PETR NIEDERHAFNER, MARTIN
ŠAFAŘÍK, JAROSLAV ŠEBESTÍK**

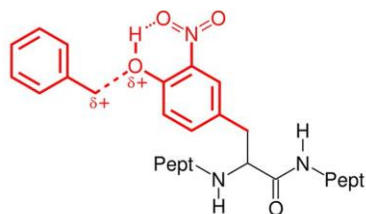
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
eva.brichtova@uochb.cas.cz

3-Nitrotyrosin vzniká přirozeně v organismu následkem oxidativního stresu. Nitraci aromatických aminokyselin (Tyr, His a Trp) může dojít ke změně konformace proteinu a ovlivnění jeho biologické aktivity. Vyšší výskyt nitrotyrosinu v proteinech byl potvrzen u některých neurodegenerativních a kardiovaskulárních chorob^{1,2}.

V naší studii jsme se zabývali přípravou 3-nitrotyrosinu s vhodně chráněnou amino a fenolickou skupinou a jeho následným použitím při *in vitro* syntéze nitrovaných proteinů, které přirozeně vznikají v organismu při oxidativním stresu.

Pro syntézu proteinů obsahujících tyrosin se běžně využívá Fmoc-Tyr(tBu)-OH, toto chránění fenolické skupiny však u 3-nitrotyrosinu kvůli interakci s nitroskupinou není stabilní. Jako vhodný stavební blok jsme navrhli a připravili benzylem chráněný 3-nitrotyrosin (Fmoc-Nit(Bzl)-OH). Ve většině případů poskytuje syntéza peptidů obsahujících 3-nitrotyrosin vyšší výtěžky při použití benzylového chránění než bez něj. Proteiny obsahující více 3-nitrotyrosinových residuí bylo možné připravit dokonce výhradně za pomoci výše zmíněného benzylového chránění.

U 3-nitrotyrosinu je chránění fenolické skupiny kvůli interakci s nitroskupinou (obr. 1) mnohem labilnější v kyselém prostředí než v případě tyrosinu. Odstranění benzylového probíhá za použití 80% kyseliny trifluoroctové velmi rychle ($k = 15,3 \text{ s}^{-1}$ při 20 °C), což je více než 2 000 000krát rychlejší než u stejného chránění nemodifikovaného tyrosinu³.



Obr.1: Tranzitní stav štěpení benzylové skupiny je stabilizován vodíkovou vazbou s nitroskupinou.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR (14-00431S).

LITERATURA

1. Radi R.: Acc. Chem. Res. 46, 550 (2013).
2. Turko I. V., Murad F.: Pharmacol. Rev. 54, 619 (2002).
3. Niederhafner P., Šafařík M., Brichtová E., Šebestík J.: Amino Acids, doi: 10.1007/s00726-015-2163-2 (2016).

SYNTÉZA VYBRANÝCH IZOTOPOVĚ ZNAČENÝCH PURINOVÝCH DERIVÁTŮ

**JAN BUČEK, MAREK ZATLOUKAL, LUCIE
PLÍHALOVÁ, LIBOR HAVLÍČEK, KAREL DOLEŽAL**

Laboratoř růstových regulátorů & Oddělení chemické biologie a genetiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PŘF Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AVČR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc
jan.bucek@upol.cz

Purinové deriváty jsou z hlediska biologické aktivity velmi různorodé látky. Předmětem našeho studia jsou cytokininy, N⁶-substituované deriváty adeninu, a od nich odvozené sloučeniny. Tyto látky působí jako rostlinné hormony (fytohormony)¹, jejich deriváty však mohou funkčně překračovat pole rostlinné fyziologie. Za zmínku jistě stojí antisenescenční² a protinádorové³ vlastnosti některých purinových derivátů.

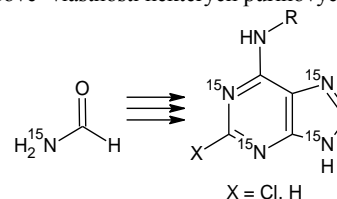


Schéma 1. Obecná reakce přípravy ¹⁵N₄-purinových derivátů z ¹⁵N-formamidu

Cílem této práce byla rozsáhlá optimalizace dvou větví tří, respektive čtyřkrokové syntézy, díky které byl následně připraven panel N⁶, respektive C²,N⁶,¹⁵N₄-purinových derivátů nesoucích v pozici N⁶ aromatické a isoprenoidní substituenty. Připravené látky vykazují vlastnosti cytokininů a inhibitorů enzymu cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (CKX), který hraje významnou roli v degradaci cytokininů. Takové deriváty mohou být díky svému izotopovému značení použity zejména pro studium endogenních hladin cytokininů za pomoci metod hmotnostní spektrometrie. Své praktické uplatnění naleznou jistě také při studiu biosyntézy cytokininů. V neposlední řadě pak při metabolických studiích jak cytokininů, tak látek s výše zmíněnými antisenescenčními či protinádorovými účinky.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR (IGA_PrF_2016_011)

LITERATURA

1. Davies P.J., v knize: *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 1. vyd., kap. 1, s. 1-15, Springer, New York 2010.
2. Szűčová L., Spíchal L., Doležal K., Zatloukal M., Greplová M., Galuszka P., Kryštof V., Voller J., Popa I., Massino F., Jorgensen F., Strnad M.: Bioorg. Med. Chem. 17, 1938 (2009).
3. Gucký T., Jorda R., Zatloukal M., Baziger V., Berka K., Řezníčková E., Béres T., Strnad M., Kryštof V.: J. Org. Chem. 56, 6234 (2013).

NOVÝ PŘÍSTUP K NUKLEOFILNÍ TETRAFLUORETHYLACI

**ALENA BUDINSKÁ^a, JIŘÍ VÁCLAVÍK^a, VÁCLAV
MATOUŠEK^c, ANTONIO TOGNI^b, PETR BEIER^{a*}**

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6;

^b Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich,
Vladimir-Prelog-Weg 2, 8093 Zürich;

^c CF Plus Chemicals, Kamenice 771/34, 625 00 Brno-
Bohunice
beier@uochb.cas.cz

Organické sloučeniny obsahující fluor jsou v přírodě spíše vzácné, přesto dnes díky svým jedinečným vlastnostem nacházejí uplatnění jako např. léčiva, agrochemikálie, polymerní materiály či kapalné krystaly¹. Široká škála využití organofluorových sloučenin souvisí s rozvojem efektivních metod, jak takové látky připravit.

Zavedení tetrafluorethylové skupiny (R-CF₂CF₂-) je možné realizovat pomocí činidel pro elektrofilní², nukleofilní³ či radikálovou⁴ fluoralkylaci. Tato práce vychází ze substituovaných tetrafluorethylbromidů (1–6), ze kterých je *in-situ* generováno činido R-CF₂CF₂MgCl a jeho použití je následně ukázáno na nukleofilních adičních reakcích.

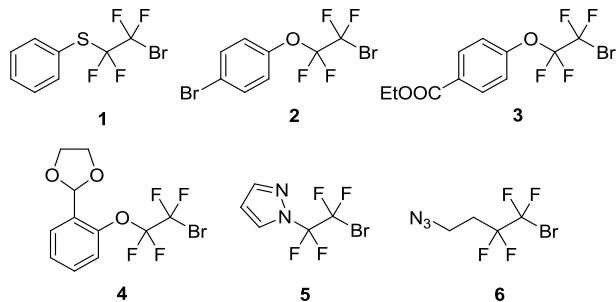


Schéma 1. Výchozí tetrafluorethylbromidy 1–6

Reakce byla testována při adicích na karbonylové sloučeniny, cyklické sulfáty a sulfamidáty, sulfonyliminy či nitrony a odpovídající produkty byly izolovány ve vysokých výtěžcích. Popsaná metoda také toleruje přítomnost některých funkčních skupin (např. esterových) a umožňuje tak selektivní zavedení poměrně vzácného uskupení -CF₂CF₂- do širokého spektra organických molekul.

LITERATURA

1. Kirsch P.: *Modern Fluoroorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim 2004.
2. Matoušek V., Václavík J., Hájek P., Charpentier J., Blastik Z. E., Pietrasiak E., Budinská A., Togni A., Beier P.: *Chem. Eur. J.* 22, 417 (2015)
3. Chernykh Y., Opekar S., Klepetářová B., Beier P.: *Synlett* 23, 1187 (2012)
4. Chernykh Y., Hlat-Glembová K., Klepetářová B., Beier P.: *Eur. J. Org. Chem.* 2011, 4528.

IDENTIFIKACE ENZYMŮVÝCH VARIANT NOVOU VYSOKO PRŮCHOZÍ TECHNIKOU KOMBINUJÍCÍ MIKROFLUIDIKU A PRŮTOKOVOU CYTOMETRII

**TOMÁŠ BURYŠKA^{a,b}, ANASTAZIA ZINCHENKO^c,
MARTIN FISCHLECHNER^d, RADEK FEDR^{b,e}, KAREL
SOUČEK^{b,e}, FLORIAN HOLLFELDER^c, JIŘÍ
DAMBORSKÝ^{a,b}, ZBYNĚK PROKOP^{a,b}**

^aLoschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí RECETOX, Masarykova univerzita, 625 00 Brno; ^bInternational Clinical Research Centre, Fakultní nemocnice u sv. Anny, 656 91 Brno; ^cDept Biochem., University of Cambridge, Cambridge CB2 1GA, U.K.; ^dInstitute for Life Sciences, University of Southampton, Southampton SO17 1BJ, U.K.; ^eOddělení cytokinetiky, Biofyzikální ústav AVČR v.v.i., 612 65 Brno bary@mail.muni.cz

Příroda poskytuje široké spektrum enzymů, které mají zajímavý potenciál pro aplikaci v biotechnologických odvětvích. Většimu rozšíření enzymů často brání některé z následujících nedostatků: malá tepelná stabilita, nízká specifická aktivita, malá enantioselektivita nebo nedostatečná odolnost vůči organickým rozpouštědlům. Je nezbytné enzymy pro tyto aplikace vhodně upravit. Cíleného vylepšení požadované vlastnosti enzymu se běžně dosahuje změnou více aminokyselin najednou. Ze sestrojené knihovny mutantů, kombinující vzniklé varianty, je potřeba identifikovat vylepšené kandidáty. Běžně používané screeningové metody jako jsou mikrotitrační destičky a robotická automatizace umožňují otestovat desítky tisíc variant, což odpovídá kombinaci nanejvýš tří pozic současně. Pro testování většího množství variant je nezbytné zavádět nové přístupy, které umožní spolehlivou analýzu knihoven milionů mutantů¹. Takové možnosti poskytuje testování v pikolitrových kapénkách dvojité emulze, voda v oleji ve vodě, vyrobené pomocí mikrofluidního čipu. Tyto 15-20 μm velké kapénky, obsazené jednou buňkou exprimující protein se specifickou mutační variací, zachovávají současně genotyp a fenotyp. Enkapsulace probíhá rychlostí až 1,8·10⁷ buněk za hodinu. Analýza a třídění kandidátů probíhá mimo mikrofluidní čip s použitím průtokové cytometrie, která efektivně vytřídí 1·10⁷ kapének za jednu hodinu. Nově vyvinutá metoda byla validována s menší knihovnou obsahující 10⁵ variant. Následně bude použita při analýze tří aktuálně konstruovaných knihoven, které kombinují mutace až ze šesti pozic současně, a kde se počet reálně testovaných variant přiblíží 10⁷. Navržené knihovny jsou zaměřené na zvýšení enzymové aktivity halogenalkandehalogenasy vůči antropogennímu polutantu 1,2,3-trichlorpropanu. Metoda umožňující prozkoumání takto velkého prostoru variací otevírá proteinovému inženýrství zcela nové možnosti.

LITERATURA

1. Zinchenko A., Devenish S. R. A., Kintsos B., Colin P. Y., Fischlechner M., Hollfelder F.: *Anal. Chem.* 86, 2526, DOI: 10.1021/ac403585p (2014).

NOVÝ TYP PROTEASOVÉHO INHIBITORU Z MOTOLICE JATERNÍ: FUNKČNÍ A STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE

MICHAL BUŠA^a, ZUZANA MATOUŠKOVÁ^a, PAVLA SOJKOVÁ-BARTOŠOVÁ^b, JIŘÍ VONDRÁŠEK^a, JOHN DALTON^c, MICHAEL MAREŠ^a, SAŠA ŠTEFANIČ^d

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha;

^bParazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR, 370 05 České Budějovice; ^cBelfast School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, BT9 7BL Belfast; ^dInstitut für Parasitologie, Universität Zürich, 8057 Zürich
busa@uochb.cas.cz

Fasciolóza způsobená motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*) je jedno z nejvýznamnějších, celosvětově rozšířených parazitárních onemocnění přežvýkavců, které způsobuje vysoké ekonomické ztráty v zemědělství. Motolice jaterní ve stále vyšší míře infikuje také člověka. Současným trendem v léčbě fasciolózy je vývoj vakcín založených na proteinových antigenech z exkrečně-sekrecčních produktů (ESP).

Tato studie je zaměřena na proteasový inhibitor FhCY2 z motolice jaterní, který byl proteomicky identifikován v ESP a je exprimován vývojovými stádii od metacerkárie až po dospělce. Fylogenetická analýza sekvence FhCY2 prokázala příslušnost FhCY2 k rodině stefinů, ale unikátním způsobem přijímá i rysy charakteristické pro příbuznou rodinu cystatinů (signální sekvence a cysteiny). To bylo potvrzeno také homologním modelováním 3D struktury FhCY2, která využívá disulfidové můstky podobně jako cystatiny. FhCY2 byl připraven v rekombinantní formě a v kinetických testech potvrdil vysokou citlivost vůči FhCY2.

Získané výsledky naznačují, že FhCY2 má duální funkci a slouží jednak jako fyziologický regulátor endogenních proteas motolice a jako modulátor proteolytického systému hostitele. FhCY2 je nový atraktivní antigen pro vývoj vakcín proti fasciolóze.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR InterBioMed LO1302 a projektu RVO 61388963.

SYNETICKÉ PŘÍSTUPY KE KARBOCYKlickÝM C-NUKLEOSIDŮM

LENKA ČERNOVÁ, LUKÁŠ MAIER, KAMIL PARUČH

Masarykova univerzita, Ústav Chemie, Kamenice 5, 635 00 Brno
lcernova@mail.muni.cz, paruch@chemi.muni.cz

Analogy nukleosidů, kde je nahrazen sacharidový zbytek příslušným karbocyklickým motivem, tvoří zajímavou skupinu látek. U C-nukleosidů je cukerná část navázaná na

heterocyklickou bázi pomocí C-C vazby. Absence přírodní N-glykosidické vazby způsobuje jejich větší odolnost vůči chemickému a enzymatickému hydrolytickému štěpení. Vzhledem k tomu, že mnoho těchto analogů je biologicky aktivních, jsou tyto sloučeniny v popředí zájmu organických chemiků i biologů¹. Modifikace kterékoli části nukleosidu může mít dopad na jeho toxikologický profil a biologickou aktivitu.

Syntetické cesty vedoucí ke karbocyklickým C-nukleosidům se v literatuře vyskytují velmi sporadicky, na rozdíl od již dobře propracované metodologie používané k přípravě klasických nukleosidových analogů s centrálním sacharidovým motivem².

V této práci je demonstrována syntéza analogů nesoucích hydroxylovou skupinu v poloze 1' (Schéma 1). Jednou z možností je nukleofilní adice organokovových nukleofilů na vhodně substituovaný cyklopentanon. Alternativní metodou je konverze na enol triflát, jeho coupling s vhodnými partnery, epoxidace a následné transformace výsledného epoxidu vedoucí k novým analogům substituovaným v pozici 6'.

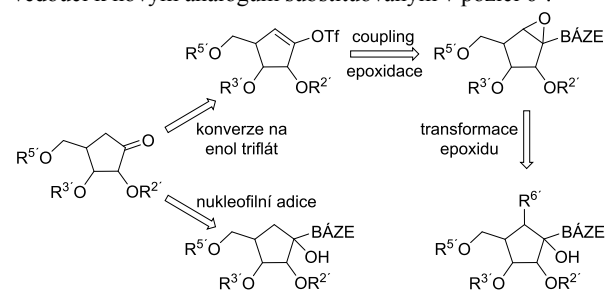


Schéma 1. Syntetické cesty vedoucí ke dvěma třídám karbocyklických C-nukleosidů.

Tato práce vznikla za podpory grantu EU (FP7-PEOPLE-IRG-2008) – Marie Curie Reintegration Grant 230936.

LITERATURA

1. Herdewijn P., v knize: *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Wiley-VCH, Weinheim 2002.
2. Jordheim L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 447 (2013).

ROLE BAZICKÉ OBLASTI NUKLEOKAPSIDOVÉHO PROTEINU MASONOVA-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU BĚHEM SKLÁDÁNÍ NEZRALÝCH RETROVIROVÝCH ČÁSTIC

ALŽBĚTA DOSTÁLKOVÁ^a, ROMANA HADRAVOVÁ^b, MICHAELA RUMLOVÁ^a

^aVysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
alzbeta.dostalkova@vscht.cz

Masonův-Pfizerův opičí virus (M-PMV) patří mezi RNA obalené viry. Spolu s virem lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1) se M-PMV řadí do čeledi *Retroviridae*. Retroviry způsobují celou řadu závažných onemocnění, z nichž celosvětově nejrozšířenější je onemocnění získané imunitní nedostatečností (AIDS), způsobené HIV-1. I přes mnohaletý, intenzivní výzkum nebyl lék na tuto nemoc doposud nalezen. V současné době se pro léčbu pacientů využívá kombinovaná léčba, tzv. HAART (z angl. Highly Active Antiretroviral Therapy), která je založena na kombinaci několika látek inhibujících zejména virové enzymy, proteasu, reverzní transkriptasu a integrasu, kritické pro životní cyklus retroviru. Vzhledem k variabilitě genomu HIV-1 se však brzy po zahájení léčby objevují rezistentní kmeny a léky se stávají neúčinnými. Z těchto důvodů je nezbytné neustále hledat a vyvíjet nové sloučeniny, inhibující i další kroky, kritické pro replikaci viru. Jedním z těchto kroků je i skládání nezralé retrovirové částice. Skládání retrovirové částice se odehrává za současné inkorporace virové genomové RNA. Interakce mezi proteiny a RNA, vedoucí k tvorbě retrovirových částic, jsou zprostředkovány především nukleokapsidovým (NC) proteinem. Retrovirové NC mají jeden nebo dva motivy zinkových prstů, které jsou zodpovědné za vazbu RNA. Kromě tohoto motivu, byla u několika zástupců retrovirů, jako např. M-PMV¹, MLV² a HIV-1³, identifikována oblast NC, bohatá na bazické aminokyseliny. Tato oblast ovlivňuje skládání částic a inkorporaci RNA. V naší laboratoři jsme identifikovali v N-koncové části NC úsek pěti aminokyselin KNKEK, který značně ovlivňuje tvorbu částic a byl nazván bazická oblast¹. Provedli jsme detailní mutační analýzu KNKEK oblasti, ve které byly jednotlivé aminokyseliny postupně substituovány za nepolární alaniny či opačně nabitě aminokyseliny. Příslušné mutace byly vneseny do M-PMV provirových konstruktů a studovány v 293-HEK buňkách. Naše výsledky naznačují, že tato oblast ovlivňuje nejen inkorporaci retrovirové genomové RNA, ale také místo skládání částice a následně i infektivitu.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 14-15326S.

LITERATURA

1. Bohmova K., Hadravová R., Štokrová J., Tůma R., Ruml T., Pichová I., Rumlová M.: *J. Virol.* 84, 1977 (2010).
2. Bowzard J.B., Bennett R.P., Krishna N.K., Ernst S.M., Rein A., Wills J.W.: *J. Virol.* 72, 9034 (1998).
3. Cimarelli A., Sandin S., Höglund S., Luban J.: *J. Virol.* 74, 3046 (2000).

PRODUKCE A SEKRECE FAKTORŮ VIRULENCE *BORDETELLA PERTUSSIS*

JAKUB DRŽMÍŠEK, BRANISLAV VEČEREK

*Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč
drzmisek@biomed.cas.cz*

Bordetella pertussis je lidský patogen, který způsobuje infekční onemocnění nazývané černý či dávivý kašel. K úspěšné infekci a kolonizaci hostitele využívá řadu faktorů virulence, jako jsou toxiny (adenylát cyklázový toxin, pertuzový toxin) a adheziny (filamentózní hemagglutinin, pertaktin, fimbrie).

Kromě těchto hlavních faktorů byl u rodu *Bordetella* nalezen také sekreční systém typu 3 (T3SS), který byl již dobře popsán např. u bakterií rodu *Yersinia* nebo *Salmonella*. Struktura T3SS je podobná jehle, která po kontaktu s hostitelem sekretuje efektorové proteiny BopC a BopN přímo do cytoplazmy hostitelské buňky propojením jehly s translokátorovými proteiny BopB a BopD. Tyto proteiny jsou rovněž sekretovány pomocí T3SS a po integraci do hostitelské membrány vytvářejí pór¹. Funkční translokon je dokončen následnou interakcí s proteinem Bsp22, který tvoří špičku jehly T3SS². V návaznosti na naši předchozí charakterizaci delečního mutantu genu kódujícího RNA chaperon Hfq (*Δhfq*), která prokázala, že protein Hfq je nezbytný pro řádnou funkci T3SS³, byly připraveny rekombinantní proteiny BopB, BopD, BopC, BopN. S jejich pomocí byly získány specifické protilátky potřebné ke studiu funkčnosti sekrečního systému a buněčné lokalizace těchto proteinů. Pomocí získaných protilátek byla poprvé detegována *in vitro* sekrece proteinu BopC kmenem *B. pertussis* po pasáži v lidských makrofázích. Dále jsme analyzovali pórtvornou aktivitu proteinů BopB a BopD pomocí modelu planárních lipidických membrán. Zjistili jsme, že samotný protein BopB postačoval k vytvoření stabilního póru, zatímco BopD tuto aktivitu nevykazoval.

Dále byla porovnána produkce a sekrece proteinů v divokém a *Δhfq* kmenu před i po pasáži v lidských makrofázích. Byly zjištěny rozdíly v množství sekretovaných a membránových proteinů a některé z těchto proteinů byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto výsledky byly v souladu s našimi předchozími již publikovanými transkriptomickými daty³.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA CR 16-34825L.

LITERATURA

1. Nogawa H., Kuwae A., Matsuzawa T., Abe A.: *J. Bacteriol.* 186, 3806 (2004).
2. Mattoo S., Yuk M. H., Huang L. L., Miller J. F.: *Mol. Microbiol.* 52, 1201 (2004).
3. Bibová I., Hot D., Keidel K., Amman F., Slupek S., Černý O., Gross R., Večerek B.: *RNA Biol.* 12, 175 (2015).

VYUŽITIE „ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY“ NA DETEKCIU PROTEÍNOVEJ INTERAKCIE V PROMÓTOROVEJ OBLASTI GENU *OVOL2*

**LUBICA ĎUĐÁKOVÁ^a, PETRA LIŠKOVÁ^{a,b},
MICHAEL E. CHEETHAM^c, ALISON J.
HARDCASTLE^c, STANISLAV KMOCH^a**

*^aÚstav dědičných metabolických poruch, VFN a 1. LF UK, 128 08 Praha 2; ^bOční klinika, VFN a 1. LF UK, 128 08 Praha 2; ^cUCL Institute of Ophthalmology, University College London, London EC1V 9EL, UK
dudakova.lubica@gmail.com*

Objev nového genu zodpovědného za vznik PPCD1 (zadnej polymorfnej dystrofie rohovky typ 1) v promótorovej oblasti genu *OVOL2* (Ovo-Like Zinc Finger 2)¹ nás viedol k zahájeniu funkčných štúdií na objasnenie mechanizmu

vzniku tohto ochorenia. EMSA (electrophoretic mobility shift assay) umožňuje vizualizovať interakcie NK (nukleových kyselín) a proteínov. Táto metóda je založená na princípe afinitnej elektroforézy a väzba proteínu do komplexu s nukleovou kyselinou je detegovaná na základe rozdielov v pohyblivosti molekúl².

Pre každú z doteraz popísaných mutácií (4) sme pripravili krátke oligonukleotidy odpovedajúce wild-type a mutovaným oblastiam promotora *OVOL2*. Tie sme pomocou terminálnej kinázy označili rádioaktívne značeným ATP. Zmiešaním takto pripravených prób s nukleárnym extraktom získaným z HEK293 buniek sme pomocou natívnej elektroforézy detegovali stratu väzobného miesta proteínu pre jednu z mutácií a vytvorenie nového väzobného miesta u zvyšných troch mutácií.

Dalším krokom bude izolácia komplexu proteínov s NK a ich charakteristika pomocou hmotnostnej spektrometrie. Tento postup nám umožní určiť proteín (transkripčný faktor alebo represor), ktorý sa viaže alebo stráca väzbu v dôsledku mutácie. Toto zistenie bude potvrdené pomocou tzv. „supershift“ assaye, kedy sa ku komplexu proteínu a NK pridá špecifická protilátka, alebo pomocou WEMSA assaye (Western blot kombinovaný s EMSA).

Naša práca pomáha objasniť funkčné dôsledky vzniknutých mutácií a v širšom kontexte tiež objasniť reguláciu génovej expzie a funkciu génu *OVOL2*.

Táto práca vznikla za podpory PRVOUK-P24/LF1/3.

LITERATÚRA

- Davidson A.E., Liskova P., Evans C.J., Dudakova L., Nosková L., Pontikos N., Hartmannová H., Hodaňová K., Stránecký V., Kozmík Z., Levis H.J., Idigo N., Sasai N., Maher G.J., Bellingham J., Veli N., Ebenezer N.D., Cheatham M.E., Daniels J.T., Thaug C.M.H., Jirsova K., Plagnol V., Filipec M., Kmoch S., Tuft S.J., Hardcastle A.J.: *Am. J. Hum. Genet.* 98, 1 (2016).
- Pulin-Laprade D., Burrus V.: *Methods Mol. Biol.* 1334, 1 (2015).

FYZIOLOGICKÉ HLADINY 2-HYDROXY-GLUTARÁTU REGULUJÚ PROLIFERACIU PRIMÁRNÝCH FIBROBLASTŮ

ALEŠ DVOŘÁK^{*ab}, JAROSLAV ZELENKA^a, KATARÍNA SMOLKOVÁ^a, LIBOR VÍTEK^b, PETR JEŽEK^a

^aOddělení Biofyziky membránového transportu, Fyziologický ústav, Akademie věd ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč; ^b ÚLBD, 1. LF UK, Na Bojišti 3, 128 08 Praha 2
aleshdvorak@gmail.com

Mitochondriální isocitrát dehydrogenasa 2 (IDH2) katalyzuje redukční karboxylaci (RK, reverzní dráha Krebsova cyklu) a syntézu 2-hydroxyglutarátu (2HG) – metabolitu, jehož fyziologický i klinický význam je v posledních letech stále intenzivněji zkoumán. 2HG může být syntetizován také v cytosolu, a v obou kompartmentech se na

jeho syntéze podílí (mimo IDH2 a IDH1) i několik dalších enzymů. 2HG se tak krom diagnostiky (rakovinný marker) uplatňuje i jako významná regulační molekula. Bývá označován jako možný inhibitor α -ketoglutarát-dependentních dioxygenas (2OG-DD), jež se podílejí na různých epigenetických změnách a zvyšují malignitu rakovinného fenotypu spojenou se změnou proliferace¹.

V této práci byl zkoumán význam 2HG v potkaních primárních fibroblastech (F3), neuroblastomových SHSY5Y, ale i v dalších buňkách. Byla použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, kde byla měřena míra RK díky izotopickému značení a syntéza 2HG, společně s koncentrací dalších metabolitů po derivatizaci vzorků s BSTFA. Krom koncentrace 2HG byl sledován i poměr 2HG/2OG s odkazem na zmíněnou inhibici 2OG-DD.

RK a syntéza 2HG byla detegována hned u několika nejen lidských nádorových i nenádorových linií, včetně F3. Ukázalo se, že v prostředí, jež simulovalo hojení ran spojené s vyšší proliferací fibroblastů (hypoxie, stimulace sérem), docházelo k dramatickému zvýšení hladiny 2HG i 2HG/2OG u F3, což bylo doprovázeno i nárůstem buněčné hmoty. Na základě těchto výsledků byl 2HG přidáván přímo do média a proliferace F3 byla úměrná právě jeho koncentraci. Stejně výsledky ovšem nebylo možné potvrdit u SHSY5Y. Ve snaze objasnit molekulární mechanismus regulace jsme se zaměřili na mTOR a HIF1 α . Metodou Western Blot jsme ale neprokázali, že dochází k fosforylaci ribosomálního S6 proteinu, který je „downstream“ efektem mTOR. Naměřená data však napovídají, že může docházet ke stabilizaci HIF1 α . Naše předběžné výsledky na dalších nádorových i zdravých liniích naznačují, že právě poměr 2HG/2OG by mohl být pomocný pro stanovení fenotypu či transformace buňky.

Výsledky demonstrují, že 2HG může být syntetizován i v nenádorových buňkách, a navíc že ve zdravých buňkách jeho fyziologické hladiny ovlivňují proliferaci.

LITERATURA

- Xu W., Yang H., Liu Y., Yang Y., Wang P., Kim S.-H., Ito S., Yang C., Wang P., Xiao M.-T., Liu L.-X., Jiang W.-Q., Liu J., Zhang J.-Y., Wang B., Frye S., Zhang Y., Xu Y.-H., Lei Q.-Y., Guan K.-L., Zhao S.-M., Xiong Y.: *Cancer Cell.* 19, 17 (2011).

ZAVÁDĚNÍ SUBSTITUENTŮ NA CUCURBITURILY

MARKÉTA ENDERESOVÁ, LAURA GILBERG, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ*

Ústav chemie, Masarykova univerzita; Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, 625 00 Brno
m.enderesova@mail.muni.cz

Cucurbiturily jsou makrocyclické sloučeniny schopné vázat uvnitř kavity kationty, ze kterých mají největší význam amoniové soli. Velkou výzvou v chemii cucurbiturilů je modifikace základního skeletu jejich struktury. Je popsáno mnoho způsobů, jak získat substituce v poloze methinových glykolurilových uhlíků, avšak jen málo příkladů modifikací na

methylenovém můstku spojujícím dvě glykolurilové jednotky¹.

Zde popisují syntézu vedoucí k novým modifikovaným cucurbit[6]urilům se substitucí na jednom methylenovém můstku. Makrocykly byly připraveny reakcí hexameru glykolurilu se sérií různých aldehydů, které na strukturu zavádějí substituent, popřípadě funkční skupinu². Byly také měřeny asociační konstanty s hosty s jednou nebo dvěma amoniiovými skupinami.

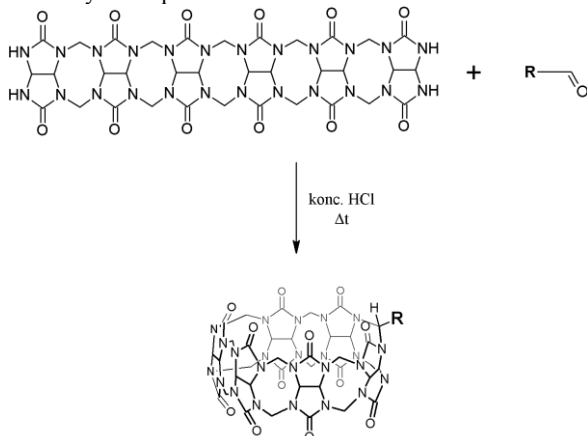


Schéma 1. Syntéza monosubstituovaných cucurbit[6]urilů reakcí hexameru glykolurilu s různými aldehydy

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (13-15576S).

LITERATURA

- Lucas D., Minami T., Iannuzzi G., Cao L., Wittenberg J. B., Anzenbacher P., Isaacs L.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 17966 (2011).
- Gilberg L., Khan M. S. A., Enderesova M., Sindelar V.: *Org. Lett.* 16, 2446 (2014).

IMUNOSENZORY PRO RYCHLOU DETEKCI PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ

ZDENĚK FARKA*, DAVID KOVÁŘ, TOMÁŠ JUŘÍK, PETR SKLÁDAL

CEITEC MU, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
farka@mail.muni.cz

Detekce patogenních mikroorganismů nabývá celospolečenského významu od zdravotnictví přes potravinářství až po detekci biologických zbraní. Cílem je co nejcitlivější detekce v co nejkratším čase. Hojně rozšířené metody jako ELISA nebo PCR mohou poskytovat nízké limity detekce, ale jsou časově náročné (několik hodin). V mnoha případech je však klíčové provést detekci mikroorganismů co nejdříve (v řádu minut). To umožňují imunosenzory, které spojují vysoce citlivý biologický prvek s elektronikou pro okamžitou analýzu.

Bez značkové imunosenzory založené na metodách EIS (elektrochemická impedanční spektroskopie), QCM (křemenné mikrováčky) a SPR (povrchová plasmonová rezonance) byly navrženy a testovány pro detekci bakterií v reálných vzorcích¹.

Pro využití v potravinářství byl vyvinut EIS biosensor umožňující detekci bakterie *Salmonella Typhimurium* v mléku. Specifické protilátky byly imobilizovány na síťotiskovou elektrodu, ta byla inkubována přímo se vzorkem mléka a vazba bakterie byla měřena jako změna impedance. Doba analýzy byla 20 min včetně přípravy vzorku a sensor umožňoval detegovat koncentraci 10^3 CFU·ml⁻¹, stanovení nebylo ovlivněno přítomností jiných mikroorganismů.

U biologických zbraní hrozí navíc nebezpečí šíření bakterií ve formě bioaerosolu, což zvyšuje nároky na detekční zařízení. Sensor na bázi QCM byl spojen s cyklónem pro on-line detekci modelového mikroorganismu (*E. coli*)². Pro bezpečné provádění experimentů byla sestrojena bioaerosolová komora, vzorek byl rozprašován pomocí piezoelektrického prvku a měření probíhalo plně automaticky. Sensor umožňoval detegovat 10^4 CFU·l⁻¹ vzduchu za pouhých 16 min.

Dosažené výsledky potvrzují, že imunosenzory umožňují rychlou a citlivou detekci bakterií, a tak mohou plnohodnotně nahradit dosud používané metody. Díky variabilitě dostupných převodníků lze navíc pro každou situaci zvolit optimální řešení.

Tento výzkum byl finančně podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601).

LITERATURA

- Farka Z., Kovář D., Skládal P.: *Sensors* 15, 1 (2015).
- Kovář D., Farka Z., Skládal P.: *Anal. Chem.* 86, 17 (2014).

VLIV PODMINEK PROSTŘEDÍ NA AUTOFOSFORYLACNÍ AKTIVITU HISTIDINKINASY S GLOBINOVOU STRUKTUROU SENZOROVÉ DOMÉNY (AfGcHK)

VERONIKA FOJTIKOVÁ, MARTIN STRANA, TORU SHIMIZU, MARKĚTA MARTINKOVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Hlavova 2030-8, 128 00 Praha 2
fojtkiv@natur.cuni.cz

AfGcHK náleží do skupiny dvousložkových signálních systémů podílejících se na regulaci důležitých bakteriálních funkcí¹. Některé z těchto funkcí (virulence, tvorba biofilmu, sporulace, rezistence vůči antibiotikům) mohou významně ovlivnit také život člověka, který je daným bakteriím vystaven. Na studium těchto systémů je proto v posledních letech kladen stále větší důraz, zejména s cílem vyvinout nová mikrobiální léčiva. V první fázi výzkumu je však nezbytně nutné detailně prozkoumat vztah mezi signálem z prostředí a výslednou odpovědí.

Dvousložkové signální systémy jsou tvořeny dvěma proteiny - histidinkinasou, která váže signální molekulu a proteinem regulujícím odpověď (RR), který na základě signálu aktivuje výše zmíněné bakteriální funkce. AfGCHK je tvořen sensorovou doménou obsahující molekulu hemu a funkční doménou s histidinkinasovou aktivitou. Po vazbě cílové molekuly k hemu dochází ke strukturálním změnám, které jsou signálem pro autofosforylační aktivitu AfGCHK (prostřednictvím ATP je fosforylováno místo His183). Fosfátová skupina je poté přenesena na RR protein (konkrétně na místa Asp52 a Asp169). Tímto je aktivována jeho funkce (funkce studovaného RR proteinu zatím nebyla plně objasněna, nicméně pravděpodobně se jedná o transkripční faktor).

Provedli jsme enzymovou analýzu AfGCHK, a to při různých reakčních podmínkách (redukční prostředí, kyslík, oxid uhelnatý, přítomnost RR proteinu, apoforma AfGCHK)². Bylo sledováno, jak tyto podmínky ovlivní enzymové parametry autofosforylační reakce proteinu AfGCHK. Z výsledků vyplývá, že konfigurace molekuly hemu v sensorové doméně proteinu AfGCHK hraje důležitou úlohu v regulaci jeho autofosforylační aktivity. V závislosti na této konfiguraci dochází ke změně afinity enzymu k substrátu (ATP), což bylo prokázáno odlišnými hodnotami K_m^{ATP} . Dále bylo zjištěno, že v přítomnosti RR proteinu dochází ke zvýšení hodnoty K_m^{ATP} . Vazebné místo pro RR protein je tak pravděpodobně lokalizováno v blízkosti vazebného místa pro ATP.

Tato práce vznikla za podpory GAUK 362115.

LITERATURA

1. Shimizu T., Huang D., Yan F., Stranova M., Bartosova M., Fojtikova V., Martinkova M.: *Chem. Rev.* 115, 6491 (2015).
2. Fojtikova V., Stranova M., Vos M., Liebl U., Hranicek J., Kitanishi K., Shimizu T., Martinkova M.: *Biochemistry* 54, 5017 (2015).

VPLYV 9-DEAZA ANALÓGOV CYTOKINÍNŮ NA VÁZBOVÉ VLASTNOSTI CYTOKINÍNOVÉHO RECEPTORA AHK4 U *Arabidopsis thaliana*

LUCIA GALLOVÁ^{a*}, ZOLIA GANDARA^a, VÁCLAV BAZGIER^{b,c}, KAREL BERKA^c, LUKÁŠ SPÍCHAL^{a*}

^aOddělení chemické biologie a genetiky, CR-Haná, PŘF UP, 783 71 Olomouc; ^bLaboratoř růstových regulátorů a Odd. chem. biol. a gen., CR-Haná, PŘF UP a Ústav experimentální botaniky AV ČR, 783 71 Olomouc; ^cOddělení fyzikální chemie, PŘF UP, 771 46 Olomouc
lucia.gallova@upol.cz, lukas.spichal@upol.cz

Proces rastu a vývoja mnohobunkových organizmov je z veľkej časti regulovaný hormonálne. Na rozdiel od živočíšnych hormónov, rastlinné fytohormóny môžu byť syntetizované každou bunkou organizmu a transportované na miesto účinku. Z fytohormónov sa tak stávajú silné nástroje, ovplyvňujúce život rastliny od klíčenia, počas životného cyklu až po jej programovanú smrť.

Prirodzene sa vyskytujúce cytokiníny, ako jedny z hlavných skupín fytohormónov, sú z chemického hľadiska *N*⁶-substituovanými derivátmi adenínu, syntetické zlúčeniny spadajú do kategórie derivátov fenylmočoviny. Percepcia cytokinínového signálu je vedená cez dvojkomponentný transportný systém, pozostávajúci z transmembránových histidín kináz s väzbovou CHASE doménou, intracelulárnych prenášačových proteínov, regulátorov odpovedi až k spusteniu expície cieľových génov¹.

U modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* boli charakterizované 3 cytokinínové receptory – AHK2, AHK3, AHK4¹. Na základe kryštalickej štruktúry AHK4 sa zistilo, že cytokiníny aktivujú väzbové miesto tvorbou vodíkových väzieb cez pozíciu *N*⁶ a *N*⁷ atómov adenínového kruhu s Asp285 CHASE domény a taktiež v pozícii *N*⁹². Pre lepšie objasnenie väzby receptor-ligand boli syntetizované 9-deaza deriváty vybraných cytokinínov a následne testovaný ich vplyv na zmenu aktivity a afinity. Výsledky ukázali, že chýbajúca väzba na *N*⁹ nielen znížila afinitu ale dramaticky ovplyvnila i schopnosť aktivácie receptora. Experimentálne výsledky boli porovnané s počítačovým modelingom AHK4 v rôznych konformáciách a stanovený potenciálny mechanizmus aktivácie cytokinínového receptora.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA_PrF_2015_024.

LITERATÚRA

1. Spíchal L.: *Funct. Plant Biol.* 39, 4 (2012).
2. Hothorn M., Dabi T., Chory J.: *Nat. Chem. Biol.* 7, 11 (2011).

SYNTHESIS OF OPTICALLY PURE HELICALLY CHIRAL 2-AMINO HETEROHELICENES AS PRECURSORS FOR NHC LIGANDS.

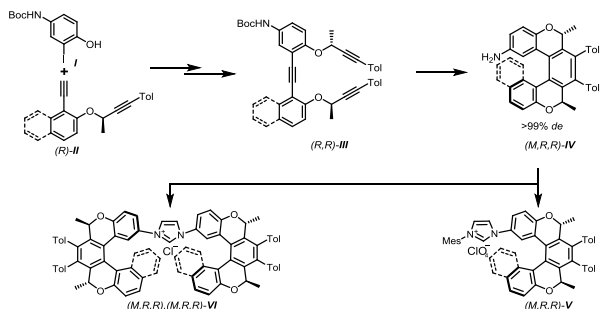
ISABEL GAY SÁNCHEZ, MICHAL ŠÁMAL, IRENA G. STARÁ*, IVO STARÝ*

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6
sanchez@uochb.cas.cz*

N-Heterocyclic carbenes (NHCs) belong to the most successful ligands that have recently been used in catalysis with late transition metals due to their strong σ -donating properties¹. These types of carbenes are generated in situ from the corresponding azolium salts prepared from primary amines. Helicenes are *ortho*-fused aromatics with inherent helical chirality that have rarely been used in enantioselective catalysis. Recently, we have published a reliable method for the preparation of optically pure heterohelicenes with 2*H*-pyran structure based on diastereoselective [2+2+2] cyclootrimerization of centrally chiral substituted aromatic triynes catalyzed by complexes of Ni(0) or Co(I)².

Here, we report on the synthesis of 2-amino[5]- and [6]heterohelicenes **IV** that represent a new type of the NHC ligand precursors (Scheme 1). The key triyne (*R,R*)-**III** was prepared by a sequence of Sonogashira coupling/Mitsunobu reaction. The subsequent diastereoselective [2+2+2]

cyclotrimerization furnished the helically chiral amines (*M,R,R*)-**IV** with >99% de. The corresponding imidazolium salts (*M,R,R*)-**V** and (*M,R,R*),(*M,R,R*)-**VI** were synthesized and their use in enantioselective catalysis is currently under investigation.



Scheme 1.

This work was supported by the Czech Science Foundation (Reg. No. 14-29667S) and IOCB ASCR (RVO: 61388963).

REFERENCES

1. Díez-González S., Marion N., Nolan S. P.: Chem. Rev. 109, 3612 (2009).
2. Žádný J., Jančařík A., Andronova A., Šámal M., Vacek Chocholoušová J., Vacek J., Pohl R., Šaman D., Císařová I., Stará I. G., Starý I.: Angew. Chem., Int. Ed. 51, 5857 (2012).

STUDIE LIDSKÝCH SLIN A ÚČINNÝCH LÁTEK OBSAŽENÝCH V OROMUKOSÁLNÍCH PŘÍPRAVČÍCH TECHNIKAMI POVRCHEM ZESÍLENÉ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE

MICHAELA GRÁFOVÁ^a, PAVEL MATĚJKA^b

^aÚstav analytické chemie, ^bÚstav fyzikální chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
Michaela.Grafova@vscht.cz

Jednotlivé látky v lidských slinách jsou v závislosti na zdravotním stavu jedince a jeho životním stylu, denním či hormonálním cyklu zastoupeny v proměnlivém složení. Obsažené proteiny a peptidy jsou vhodnými biomarkery pro lékařskou diagnostiku. Je známo, že určitá onemocnění způsobují v ústech patologické změny, které často předcházejí systémovým projevům. Sliny a jejich komponenty mohou být po navázání na nanostrukturní plasmonický substrát studovány technikami povrchem zesílené vibrační spektroskopie (SEVS), vykazujícími zesílení příslušných signálů nejméně o dva až tři řády ve srovnání s běžnými spektroskopickými metodami.

Elektrochemický způsob přípravy kovových nanostrukturních SEVS-aktivních substrátů (obvykle Ag, Cu, Au) je po léta vyvíjen výzkumnou skupinou na VŠCHT^{1,2}. Nanostrukturní kovová vrstva se připravuje katodickou depozicí na Pt terčik, který je poté vložen do roztoku slin po dobu, která je nezbytná pro spolehlivé vytvoření adsorbovaných vrstev vhodných pro SEVS analýzu (obvykle 24 hodin).

Tato studie se zaměřuje na sledování spektrálních změn, způsobených změnami teploty deponovaného vzorku slin, v rozmezí 10 °C až 45 °C. Spektrální stabilitu při dané teplotě lze sledovat pomocí opakovaných měření ve stejných bodech spektrální mapy SEVS-aktivních substrátů s adsorbovaným vzorkem slin. Dále byly testovány různé způsoby odběru slin, a to jednak s použitím odběrného zařízení Salivette (vatový tampon s centrifugační zkušavkou) a také pasivním sliněním.

Kromě slin je výzkum věnován sledování výskytu oromukosálního přípravku ve slinách (pouze jeho účinné složky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) za použití velkoplošných SEVS-aktivních substrátů, ale také plasmonických nanočástic. Některá léčiva přetrvávají v ústech po delší dobu díky adsorpci na sliznici ústní dutiny. Testované použité látky oromukosálních přípravků jsou dostupné bez lékařského předpisu (např. chlorhexidin hydrochlorid, benzydamin hydrochlorid, kofein, lidokain, či dextromethorphan hydrobromid). K popisu variability dat se využívá analýza hlavních komponent (PCA), měkké nezávislé modelování podobnosti tříd (SIMCA) a regresní metoda částečných nejmenších čtverců (PLS).

LITERATURA

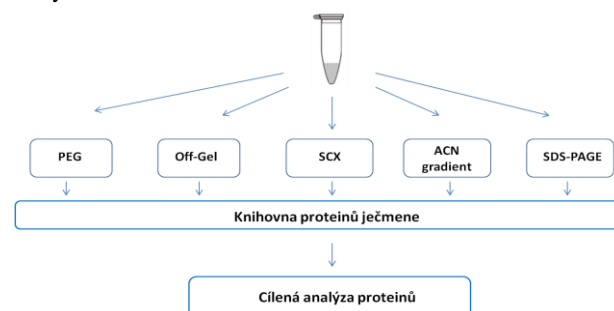
1. Prokopec V., Čejková J., Matějka P., Hasal P.: Surf. Interface Anal. 40, 601 (2008).
2. Člupěk M., Prokopec V., Matějka P., Volka K.: J. Raman Spectrosc. 39, 515 (2008).

CÍLENÁ ANALÝZA PROTEOMU JAKO ALTERNATIVA FRAKČIONAČNÍCH METOD

HANA HABÁNOVÁ, BŘETISLAV BRZOBOHATÝ, MARTIN ČERNÝ

Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
habanova.h@seznam.cz

V minulosti bylo vyvinuto mnoho metod, které lze využít pro frakcionaci proteomu a zvýšit tak šance identifikovat i méně abundantní proteiny. Jejich velkou nevýhodou je jak vyšší časová náročnost, tak i významné navýšení nároků na množství vstupního materiálu, který je pro analýzu použit¹. Množství frakcí pak s ohledem na limitace následné LC-MS analýzy také limituje počet vzorků, které je možné souběžně analyzovat.



Obr. 1. Využití pěti komplementárních frakcionačních metod k přípravě proteinové knihovny pro cílenou analýzu

Pomocí cílené proteomické analýzy lze dosáhnout až o několik řádů vyšší citlivosti v porovnání s běžnou necílenou metodou. Současná instrumentace již umožňuje kvantifikovat více jak 1000 proteinů v hodinové analýze a je tak otázkou, zda by nemohla být dostatečnou náhradou frakcionačních technik. Jako model pro testování jsme použili proteom obilky ječmene, která má sice vysoký obsah proteinu, nicméně většinu tvoří rodina zásobních proteinů omezujících detekci dalších komponent. Využili jsme pěti odlišných technik frakcionace a celkově identifikovali přes 4 000 proteinů, což představuje zhruba trojnásobek proti běžné analýze (obr. 1). Na základě získaných dat jsme sestavili metodu pro cílenou analýzu a využili ji pro kvantifikaci identifikovaných proteinů v běžné extrakci. Naše výsledky ukazují, že cílená analýza může efektivně nahradit frakcionace a má tak velký potenciál stát se proteomickou obdobou DNA čipu.

Tato práce vznikla za podpory grantu P305/12/2144 (CSF), TE02000177 (TACR) a fondů z ERDF pro 'CEITEC-Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

LITERATURA

1. Černý M., Kuklová A., Hoehenwarter W., Fragner L., Novák O., Rotková G., Jedelský P., Žáková K., Šmehilová M., Strnad M., Weckwerth W., Brzobohatý B.: *J. Exp. Bot.* 64, 4193 (2013).

ROZDÍLNÝ VÝVOJ AMPK V KOSTERNÍM SVALU BĚHEM ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U MYŠÍ S ODLIŠNOU NÁCHYLNOSTÍ K OBEZITĚ

JANA HANSÍKOVÁ, PETRA JANOVSKÁ, JAN KOPECKÝ

*Oddělení biologie tukové tkáně, Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Vídeňská 1083, 14220 Praha 4
jana.hanskova@fgu.cas.cz*

AMP-aktivovaná proteinová kinasa (AMPK) je heterotrimerní enzym, který se v kosterním svalu podílí zejména na regulaci glukosového a lipidového metabolismu. Informace o změnách aktivity a množství AMPK v kosterním svalu v průběhu časného postnatálního vývoje, konkrétně v období mezi narozením a odstavením, jsou dosud zcela nedostatečné. Cílem projektu bylo: (i) stanovit expresi, množství proteinu a aktivitu katalytických izoforem podjednotky α (AMPK α 1 a AMPK α 2) v kosterním svalu během časného postnatálního vývoje; (ii) zjistit vliv pohlaví a rozdílného genetického pozadí na AMPK v postnatálním vývoji. Vzorky byly získány ze dvou rozdílných myších kmenů - kmene C57BL/6 (B/6), který je náchylný k dietou indukované obezitě, a kmene A/J, který je k obezitě rezistentní. Matky byly krmeny standardní dietou a mláďata obou pohlaví (M, F) byla od matky odstavena 28. den (D) po narození. AMPK byla izolována imunoprecipitací ze svalového homogenátu a aktivita byla stanovena kinasovou reakcí za použití AMP, [γ -32P]ATP a peptidového substrátu. Pro měření genové exprese byla použita metoda kvantitativní RT-PCR a množství proteinu bylo určeno metodou Western

blot. V 10D byla ve všech testovaných skupinách (A/J F, A/J M, B/6 F, B/6 M) aktivita AMPK α 1 signifikantně vyšší v porovnání s aktivitou AMPK α 2. Mezi 10D a 28D se aktivita AMPK α 1 významně snížila u obou kmenů s výjimkou A/J F. V případě kmene A/J byla aktivita AMPK α 2 v 28D vyšší než AMPK α 1. Celková aktivita AMPK (α 1+ α 2) u B/6 signifikantně poklesla mezi 10D a 28D, zatímco u A/J zůstala na stejné úrovni. Mezi 15D a 28D se celková hladina proteinu AMPK (α 1+ α 2) snižuje u B/6, signifikantně pouze u B/6 F. Expresí genu pro AMPK α 2 narůstá mezi 5D a 28D u obou kmenů. Během tohoto období, tj. období přechodu ze stravy s vysokým obsahem tuků na stravu bohatou na sacharidy, byly v kosterním svalu pozorovány kmenově specifické změny AMPK. Zatímco u kmene A/J celková aktivita AMPK zůstala stejná, u myši kmene B/6 významně poklesla. Vývojové změny v celkové aktivitě AMPK jsou způsobeny především poklesem aktivity AMPK α 1 a nekorrespondují se změnou genové exprese. Pouze u myši B/6 koreluje kinasová aktivita s hladinou proteinu (AMPK α 1 $r_s = 0,85$; AMPK α 2 $r_s = 0,63$). Rozdílné změny v aktivitě AMPK v kosterním svalu během časného postnatálního vývoje by mohly ovlivňovat náchylnost k obezitě v dospělosti, v závislosti na rozdílném genetickém pozadí myši.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR (MITOCENTRUM - grant 14-36804G).

VAZBA MUTANTNÍ P53 DO G-BOHATÝCH OBLASTÍ CÍLOVÝCH GENŮ A REGULACE JEJICH TRANSKRIPCE

ROBERT HELMA^a, TIMO QUANTE^b, IVA KEJNOVSKÁ^a, LUCIE NAVRÁTILOVÁ^a, MAREK PETRA^a, MATEJ ADÁMIK^a, WOLFGANG DEPPERT^b, GENRICH V. TOLSTONOG^b, MARIE BRÁZDOVÁ^a

*^a Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno,
^b Heinrich-Pette Institute; Leibniz Institute for Experimental Virology; Hamburg, Germany
358270@mail.muni.cz*

Nádory mozku patří mezi vysoce invazivní typy nádorů. Inaktivace specifických genů společně s bodovými mutacemi nádorového supresorového genu *TP53* je spojena s nepříznivou prognózou. Mutovaná forma proteinu (*mutp53*) se vyskytuje u více jak poloviny nádorů a disponuje novými onkogenními vlastnostmi. Jednou z vlastností *mutp53* je i schopnost přímé vazby na DNA do oblastí promotorů cílových genů a jejich následná transkripční regulace. Ve většině případů se jedná o geny spojené s nádorovou progresí².

Pomocí globálního expresního profilování po potlačení exprese endogenního *mutp53* (R273H) u glioblastomové linie U251 jsme zjistili, že se *mutp53* preferenčně váže do oblastí DNA bohatých na G/C, které se vyskytují převážně v okolí počátku transkripce¹. Zmíněné oblasti rovněž obsahují tzv. G4 motivy, které jsou náchylné ke tvorbě struktur, nazývaných G-kvadruplexy. Pomocí cirkulárního dichroismu bylo dokázáno, že *mutp53* stabilizuje strukturu G-kvadruplexů *in vitro*.

Analýza exprese cílových genů mutp53 byla provedena také s využitím metody qRT-PCR. Pro analýzu byly vybrány geny *GAS1* a *HTR2A*. Zjistili jsme, že v důsledku potlačení exprese mutp53 u linie U251 (R273H) došlo k transkripční aktivaci obou genů. Vazba mutp53 do promotorových oblastí vybraných cílových genů byla testována pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP). Ukázalo se, že mutp53 se ochotně váže na reprezentativní úseky promotorových oblastí genů *GAS1* a *HTR2A*¹ tedy, že vazba mutp53 na G-kvadruplexy, které se nachází v řadě genů zapojených do tvorby nádorů, hraje významnou roli při regulaci těchto genů.

Tato práce vznikla za podpory grantu AVČR číslo 13-36108S.

LITERATURA

1. Quante T, Otto B., Brázdová M., Kejnovská I., Deppert W., Tolstonog G. V.: *Cell Cycle* 11, 3290 (2012).
2. Brázdová M., Navrátilová L., Tichý V., Němcová K., Lexa M., Hrstka R., Pečinka P., Adámek M., Vojtesek B., Paleček E., Deppert W., Fojta M.: *PLoS One* 8, e59567 (2013).

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE DNA-PROTEIN INTERAKCÍ VYUŽÍVAJÍCÍ OLIGONUKLEOTIDY ZNAČENÉ POMOCÍ PEX REAKCE

MONIKA HERMANOVÁ, PETR ORSÁG, MIROSLAV FOJTA

*Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno
hermanova@ibp.cz*

Tato práce byla zaměřena na vývoj nové metody pro paralelní detekci DNA-protein interakcí. Dříve vyvinutý přístup využíval pro studium vazby nádorového supresoru p53 na DNA oligonukleotidy s oligo(T) přesahem, který byl modifikován komplexem oxidu osmičelého¹. Vzhledem k použití jedině redoxní značky nebylo možné přímo určit vazebné preference proteinu k jednotlivým typům DNA při kompetičním experimentu, ale muselo být využito nepřímého vyhodnocení. Z tohoto důvodu byla vyvinuta nová metoda využívající značení DNA dvěma odlišnými elektrochemicky aktivními značkami, a to nitrofenylem² a benzofurazanem³. Tyto značky byly do DNA inkorporovány metodou prodlužování primeru (PEX)⁴; jako DNA sondy byly použity oligonukleotidy obsahující nebo naopak postrádající konsensní vazebné místo proteinu p53. Vazba proteinu p53 na značenou DNA byla provedena pomocí imunoprecipitace na magnetických kuličkách¹, výsledná směs oligonukleotidů byla analyzována pomocí cyklické voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě.

Na cyklickém voltamogramu bylo ve výsledné směsi oligonukleotidů možné pozorovat jak signál odpovídající redukci nitrofenylu (při -0,5 V)², tak benzofurazanu (při -0,9 V)³. Signál pro specifickou DNA sondu (obsahující vazebné místo proteinu p53) byl při kompetičním experimentu vždy výrazně vyšší než signál pro nespecifickou sondu, a to bez ohledu na to, zda byla sonda značena nitrofenylem či benzofurazanem. Tato metoda tak umožňuje určit, ke které sondě se protein váže přednostně a po

kvantifikaci získaných výsledků může být určena relativní preference proteinu pro jednotlivé typy DNA.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 206/12/G151.

LITERATURA

1. Němcová K., Sebest P., Havran L., Orsag P., Fojta M., Pivonková H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 5843 (2014).
2. Horáková P., Macíčková-Cahová H., Pivoňková H., Špaček J., Havran L., Hocek M., Fojta M.: *Org. Biomol. Chem.* 9, 1366 (2011).
3. Balintova J., Plucnara M., Vidlakova P., Pohl R., Havran L., Fojta M., Hocek M.: *Chem. Eur. J.* 19, 12720 (2013).
4. Brazdilova P., Vrabel M., Pohl R., Pivonkova H., Havran L., Hocek M., Fojta M.: *Chem. Eur. J.* 13, 9527 (2007).

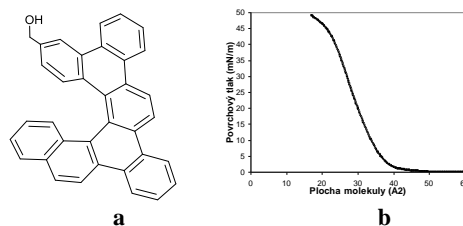
SYNTÉZA AMFIFILNÍCH HELICENŮ A JEJICH SAMOSKLADBA V TENKÝCH VRSTVÁCH

JAN HOLEC^{a,b*}, JIŘÍ RYBÁČEK^b, JIŘÍ JANOUŠEK^{a,b}, LUCIE BEDNÁROVÁ^b, IRENA G. STARÁ^b, IVO STARÝ^{b*}

*^aVŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
holec@uochb.cas.cz*

Nedávný pokrok v syntéze helicenů a jejich atraktivní fyzikálně-chemické vlastnosti se odrazilo ve zvýšeném zájmu o tyto helikální aromáty. Předpokládá se, že chirální π -elektronové systémy by mohly najít uplatnění v molekulární elektronice¹, optoelektronice a spintronice. V této souvislosti je příprava 2D uspořádaných vrstev helicenů klíčová jakož i následné studium jejich vlastností.

Pozornost byla soustředěna na tvorbu Langmuirových (L) monovrstev helicenů na fázovém rozhraní voda-vzduch a Langmuira-Blodgettové (LB) tenkých filmů na pevných substrátech (křemenné sklo, křemíkové destičky)². Byl navržen a syntetizován dibenzo[6]helicen (obr. 1a) nesoucí polární hydroxymethylovou skupinu pro zakotvení na povrchu vodné subfáze v případě L monovrstev a pro interakci s povrchem substrátu v případě LB filmů. Zaznamenaná křivka při tvorbě L monovrstev (tzv. izoterma) indikuje samoskladbu molekul racemického derivátu [6]helicenu do monovrstvy (obr. 1b).



Obr. 1. a) **Struktura 3-hydroxymethyldibenzo[6]helicenu;** b) **Izoterma zaznamenaná při tvorbě L monovrstvy**

LB filmy byly charakterizovány pomocí UV-Vis a IČ spektroskopie, AFM a SEM mikroskopie, měření kontaktního

úhlu a elipsometrie. Příprava enantiomerně čistých amfifilních helicenů, tvorba příslušných LB vrstev a studium jejich vlastností je předmětem dalšího výzkumu s využitím chiroptických metod (ECD, VCD) a měření elektrické vodivosti.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 16-08327S.

LITERATURA

1. Sahasithiwat S., Mophuang T., Menbangpung L., Kantonwong S., Sooksimuang T.: *Synth. Met.* 160, 1148 (2010).
2. Nuckolls C., Katz T. J., Verbiest T., Elshocht S., Kuball H.-G., Kiesewalter S., Lovinger A. J., Persoons A.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8656 (1998).

DLOUHODOBĚ PŮSOBÍCÍ STABILNÍ PEPTIDOVÉ ANALOGY GHRELINU – POTENCIÁLNÍ LÉČIVA PRO TERAPII KACHEXIE

MARTINA HOLUBOVÁ^a, MIROSLAVA BLECHOVÁ^a, BARBORA MIKULÁŠKOVÁ^{a,b}, ZDENA LACINOVÁ^c, MARTIN HALUŽÍK^c, BLANKA ŽELEZNÁ^a, LENKA MALETÍNSKÁ^a, JAROSLAV KUNEŠ^{a,b}

^aÚOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bFGÚ AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; ^c3. interní klinika I.LF UK a VFN, U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2
holubova@uochb.cas.cz

Ghrelín, tzv. „hormon hladu“, je doposud jediný známý orexigenní peptidový hormon pocházející z periferie. Pozitivně ovlivňuje energetickou bilanci organismu, zvyšuje příjem potravy a tělesnou hmotnost a podporuje akumulaci tukové tkáně¹. Mimo centrálního orexigenního efektu byly popsány i protizánětlivé účinky ghrelinu. V poslední době se ghrelín či další agonisté ghrelinového receptoru (GHS-R1a) dostávají do popředí zájmu jako potenciální látky k léčbě kachexie, stavu charakterizovaného fyzickým chřadnutím a ztrátou svalové i tukové hmoty, který doprovází řadu nádorových a chronických progresivních onemocnění a značně zhoršuje jejich prognózu.

Molekula ghrelinu je na serinu v pozici 3 esterifikována *n*-oktanovou kyselinou. Tato unikátní modifikace je nezbytná pro biologickou aktivitu ghrelinu, přispívá však k jeho nestabilitě. Syntetizovali jsme sérii agonistů GHS-R1a stabilizovaných záměnou Ser³ za diaminopropionovou kyselinu a dále modifikovaných začleněním dalších nekódových aminokyselin², prodloužením řetězce mastné kyseliny, inkorporací druhé mastné kyseliny či zkrácením peptidového řetězce v různých kombinacích.

Ve vazebných studiích a funkčních testech na buňkách HEK293T s transfekovaným hGHS-R1a byla ověřena vysoká afinita analogů ke GHS-R1a a aktivace signálních drah ghrelinu. V testu příjmu potravy po subkutánním (*s.c.*) podání myším (0.1-10 mg/kg) popsané analogy významně zvyšovaly příjem potravy v závislosti na dávce, přičemž účinek trval až 10 h po podání. Stabilita analogů *in vivo* po *s.c.* podání myším (5 mg/kg) byla ve srovnání s ghrelinem řádově zvýšena ($t_{1/2}$ analogů 2-4 h, $t_{1/2}$ ghrelinu 8-13 min). Jednorázové *s.c.* podání

vybraných účinných analogů myším s kachexií vyvolanou podáním bakteriálního lipopolysacharidu zvýšilo příjem potravy a expresi orexigenních neuropeptidů v mozku a snížilo krevní hladiny prozánětlivých cytokinů; obdobný účinek byl pozorován po 15-denním *s.c.* podávání vybraného analogu kachektickým potkanům po 5/6 nefrektomii. Tato data naznačují možné využití analogů ghrelinu v terapii kachexie.

Tato práce vznikla za podpory grantu RVO:61388963 AV ČR.

LITERATURA

1. Tschöp M., Smiley D. L., Heiman M. L.: *Nature* 407, 908 (2000).
2. Maletínská L., Pýchová M., Holubová M., Blechová M., Demianová Z., Elbert T., Železná B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340, 781 (2012).

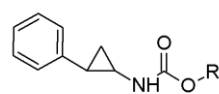
PŘÍPRAVA A STUDIUM (±)TRANS-N-(2-FENYLCYKLOPROPYL)KARBAMÁTŮ JAKO POTENCIONÁLNÍCH INHIBITORŮ ACETYLCHOLINESTERASY

EVA HORÁKOVÁ^a, PAVEL DRABINA^a, MILOŠ SEDLÁK^a

^aÚstav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
eva.horakova@student.upce.cz

Alzheimerova choroba (AD) je jednou z nejčastějších příčin demence u starších pacientů. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění, jehož příčiny vzniku nejsou zcela objasněny¹. Významnou roli při léčbě AD hraje inhibice cholinesteras (ChE). Karbamáty patří mezi významné pseudo-reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BChE)². Jedním z mála schválených léčiv AD je právě karbamát Rivastigmin (Exelon[®]).

Sloučeniny obsahující 2-fenylcyklopropanový skelet jsou významné pro svou biologickou aktivitu. První literární zmínky o syntéze sloučenin obsahujících toto uskupení byly publikovány již před více než 60 lety³ a v současnosti se vyskytuje v mnoha potencionálně biologicky aktivních látkách, např. jako selektivní inhibitory LSD1⁴.



R = 7 alkyl skupin, 4 cykloalkyl skupiny,
2 isopropylidenglykosyl skupiny,
2 glykosyl skupiny

Obr. 1. Obecný vzorec karbamátů I-XV

V této práci byla připravena série *O*-alkyl, *O*-cykloalkyl, *O*-isopropylidenglykosyl a *O*-glykosylkarbamátů I-XV odvozených od racemického *trans*-(±)-2-fenylcyklopropyl-1-aminu (obr. 1). Tyto sloučeniny byly testovány jako potencionální inhibiční agens pro AChE (IC₅₀: 58–90 μmol·l⁻¹) Ellmanovou metodou.

Všechny karbamáty I-XV jsou o řád účinnějšími inhibitory než klinicky používaný Rivastigmin (IC₅₀ = 501

$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Nejúčinnější karbamát **X** byl asymetrickou cyklopropanací připraven ve formě jednotlivých opticky čistých izomerů. U všech karbamátů byl dále stanoven rozdělovací koeficient P_{ow} a testována jejich cytotoxicita.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 14-00925S.

LITERATURA

1. Benzi G., Moretti A.: Eur. J. Pharmacol. 346, 13 (1998).
2. Jiráček R.: Psychiatrie pro praxi 2, 55 (2002).
3. Burger A., Yost W. L.: J. Am. Chem. Soc. 70, 2198 (1948).
4. Ueda R., Suzuki T., Mino K., Tsumoto H., Nakagawa H., Hasegawa M., Sasaki R., Mizukami T., Miyata N.: J. Am. Chem. Soc. 131, 17536 (2009).

RECYKLACE FLUOROFILNÍCH RUTHENIOVÝCH KOMPLEXŮ METODOU STŘEDNÍ FLUOROVÉ CHEMIE

JAN HOŠEK*, **MARKĚTA RYBÁČKOVÁ**, **JAROSLAV KVIČALA**

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

V naší laboratoři se zabýváme syntézou nových polyfluorovaných analogů ruthenioých komplexů, které je možné separovat pomocí metod fluorové chemie.

Pro mírně fluorované látky do 40 % fluoru v molekule a vysoce fluorované látky s více jak 60 % fluoru v molekule existují metody dělení, ale pro látky spadající do intervalu mezi 40 a 60 % nejsou žádné metody známe. V posledních několika měsících byla nalezena a experimentálně podložena nová metoda separace vhodná pro středně fluorované látky¹. Mimo dělení fluorovaných anilinů od nefluorovaných byla tato metoda úspěšně použita pro recyklaci fluorofilních ruthenioých komplexů **I-VI** (Schéma 1).

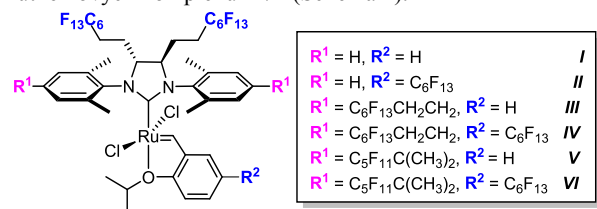


Schéma 1. Polyfluorované rutheniové komplexy **I-VI**.

Klíčovým prvkem recyklace je směs organického a polyfluorovaného rozpouštědla DCM/methyl(perfluorbutyl)-ether, která je za laboratorní teploty homogenní, ale při ochlazení na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ tvoří dvoufázový systém. Fluorofilní komplexy přecházejí převážně do spodní fluorové fáze a lze je snadno oddělit od produktů metateze, které zůstanou v horní dichlormethanové fázi. Tímto způsobem byly testovány všechny výše uvedené komplexy **I-VI** v pěti po sobě jdoucích

cyklech a dosažená konverze RCM reakce na modelovém substrátu diethyl-allylmethylmalonátu byla monitorována pomocí NMR analýzy.

Tato metoda dvoufázové separace je unikátní a budou hlouběji studovány její výhody a použití.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 207/10/1533 a MŠMT č. 20/2016.

LITERATURA

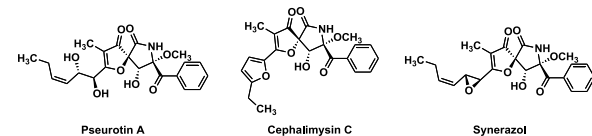
1. Hošek J., Rybáčková M., Čejka J., Cvačka J., Kvičala J.: Organometallics 34, 3327 (2015).

STEREOSELEKTIVNÍ SYNTÉZA CEPHALIMYSINU B A C

DAVID CHALUPA, **JIŘÍ PARTL**, **PETRA VOJÁČKOVÁ**, **DRAZEN PAVLOVIC**, **JAKUB ŠVENDA**

*Masarykova univerzita, Ústav chemie, Kamenice 5, 635 00 Brno
chalupa.david@mail.muni.cz, svenda@chemi.muni.cz*

Pseurotiny jsou strukturně komplexní sekundární metabolity produkované mikroskopickými houbami¹ (obr. 1). Tyto alkaloidy se vyznačují různorodou biologickou aktivitou jako je inhibice angiogeneze² nebo indukce buněčné diference³. Pseurotiny jsou charakterizovány vysoce substituovaným spirocyklickým jádrem, které se skládá z γ -laktamového a furanonového kruhu.



Obr. 1. Přehled spirocyklických alkaloidů pseurotinového typu

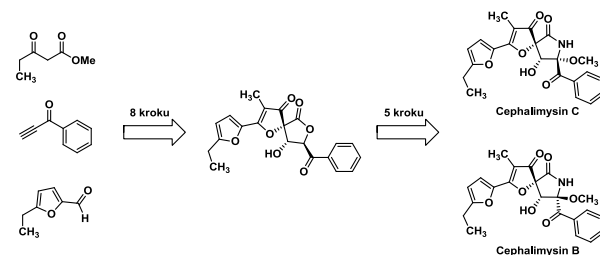


Schéma 1. Syntetická strategie pro přípravu cephalimysinu **B a C**

Naše plně syntetická strategie pro přípravu cephalimysinu **B a C** vychází ze tří komerčně dostupných látek (Schéma 1). Celá sekvence se skládá ze třinácti kroků a mezi klíčové transformace patří: rhodiumem katalyzovaná tvorba furanonového kruhu, stereoselektivní konjugovaná adice a netriviální dihydroxylace vedoucí ke spirocyklickému jádru. Syntéza byla úspěšně aplikována pro přípravu několika strukturních analogů obsahujících furanon- γ -laktamové jádro.

Tato práce vznikla za podpory Marie Curie Actions (reg. č. 322001) a Alfred Bader Foundation.

LITERATURA

1. Bloch P., Tamm, C.: *Helv. Chim. Acta.* 64, 304 (1981).
2. Asami Y., Kakeya H., Komi Y., Kojima S., Osada H.: *Cancer Sci.* 99, 1853 (2008).
3. Komagata D., Fujita S., Yamashita N., Saito S., Morino T.: *J. Antibiot.* 49, 958 (1996).

PŘÍPRAVA FUNKCIONALIZOVANÝCH NANOČÁSTIC A STUDIUM JEJICH USPOŘADÁNÍ, SPEKTRÁLNÍCH VLASTNOSTÍ A SCHOPNOSTI PŘENÁŠET NÁBOJ

JIRÍ JANOUŠEK^{a,b*}, MARTIN BĚLOHRADSKÝ^b, ROMANA HADRAVOVÁ^b, PAVEL MATĚJKA^a, STANISLAVA MATĚJKOVÁ^b, VADYM PROKOPEC^a, JIRÍ RYBÁČEK^b, IRENA G. STARÁ^b, IVO STARÝ^{b*}

^a Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
jiri.janousek@uochb.cas.cz

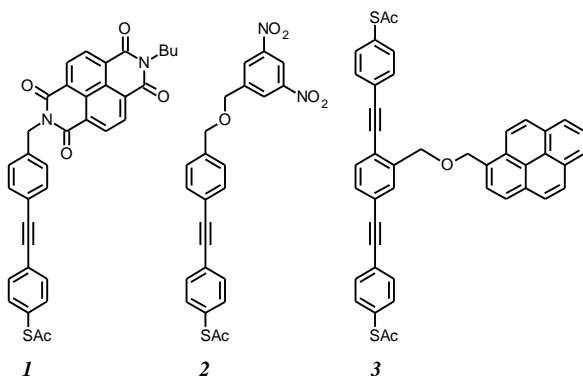


Schéma 1. Ligandy obsahující elektronakceptorní nebo elektrondonorní skupinu (1 a 2, resp. 3) a π -elektronový systém

Zlaté nanočástice jsou charakteristické svou stálostí, možností modifikace jejich povrchu a způsobem přenosu náboje, který je na rozdíl od makroskopických kovů řízen kvantovými jevy^{1,2}. Zakotvením elektrondonorních, resp. elektronakceptorních ligandů s π -elektronových skeletem (schéma 1) na Au nanočástice může dojít k ovlivnění jejich vlastností, jakými jsou například samoskladba na povrchu pevného substrátu, interakce mezi π -elektronovým systémem a povrchovými atomy nanočástic či přenos náboje ve vzniklých dvoudimenzionálních hybridních organicko-anorganických systémech.

Byla vyvinuta metodika přípravy monovrstvy Au nanočástic modifikovaných ligandy 1-3 na skleněných či křemíkových substrátech a provedena charakterizace vzniklých hybridních organicko-anorganických nanomateriálů pomocí řady mikroskopických a spektroskopických technik (SEM, AFM, UV/Vis, SERS). Následně byla studována

možnost využití aktivní monovrstvy pro konstrukci tranzistorů řízených elektrickým polem.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 16-08327S.

LITERATURA

1. Schmid, G.: *Nanoparticles: From Theory to Application.* Wiley-VCH, Weinheim 2004.
2. Daniel M.-C., Astruc D.: *Chem. Rev.* 104, 293 (2004).

MEZIDOMÉNOVÁ KOMUNIKACE V ENZYMU CELLOBIOSADEHYDROGENASE POHLEDEM HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

ALAN KÁDEK^{a,b}, DANIEL KAVAN^{a,b}, ROLAND LUDWIG^c, PETR HALADA^a, PETR MAN^{a,b}

^aMikrobiologický ústav AVČR, Videňská 1083, 142 20 Praha; ^bPřírodovědecká fakulta UK v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha; ^cVienna Institute of Biotechnology BOKU, Muthgasse 18, Videň, 1190
kadek@biomed.cas.cz

Cellobiosadehydrogenasa (CDH) je enzym produkovaný dřevokaznými houbami, který se účastní procesů depolymerace celulosy a oxidace různých poly-, di- a monosacharidů. To ji činí velice zajímavým cílem studia v oblasti biotechnologií – zejména na poli biosenzorů, alternativních paliv či biokatalýzy.

Co by jediný známý extracelulární flavocytochrom je CDH unikátní z pohledu molekulární architektury, jelikož ve své molekule kombinuje dva různé kofaktory – FAD (flavindinukleotid) v dehydrogenasové doméně a hem v doméně cytochromové. Ty jsou spojeny flexibilní peptidovou spojkou, která umožňuje jejich vzájemný pohyb, kdy při přiblížení dochází k přímému vnitřnímu přenosu elektronů mezi kofaktory, nezbytnému pro funkci enzymu. V roce 2015 byla vyřešena pomocí rentgenové difrakce struktura CDH, která poskytla statický obrázek enzymu v jeho uzavřené i otevřené konformaci¹. Pro plné pochopení funkce tohoto vysoce flexibilního enzymu však stále chybí objasnění jeho regulace a dynamiky v roztoku, což bylo cílem tohoto projektu.

CDH z dřevokazné houby *Myriococcus thermophilum* byla rekombinantně produkována v kvasinkách *Pichia pastoris* a chromatograficky purifikována do dosažení homogenity. Protein byl následně plně charakterizován z pohledu post-translačních modifikací a dále zkoumán pomocí hmotnostní spektrometrie. V této práci jsme studovali konformační změny v molekule CDH indukované změnou pH a interakci s vápenatými kationty, jelikož je známo, že funkce CDH je závislá na pH roztoku. Pro vápenaté kationty bylo navíc popsáno, že umožňují funkci CDH i za neutrálního pH, kde je jinak enzymaticky neaktivní.

Za využití kombinace technik strukturní hmotnostní spektrometrie (MS) - vodík/deuteriové výměny a nativní MS s iontovou mobilitou - a výpočetních přístupů jsme popsali mechanismus fungování CDH v roztoku. Ten jsme ukázali, že je závislý na povrchové elektrostatice na mezidoménovém

rozhraní CDH. Protonace či stínění divalentními kationty neutralizuje odpuzující se oblasti negativního náboje na rozhraní domén, což jim umožňuje se dostat do těsného kontaktu, který je nutný pro přenos elektronů a funkci enzymu.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR (P206/12/0503), UK (UNCE 204025/2012), Evropských rozvojových fondů (CZ.2.16/3.1.00/24023) a stipendia od Evropského konsorcia pro strukturní biologii InStruct,

LITERATURA

1. Tan T. C., Kracher D., Gandini R., Sygmund C., Kittl R., Haltrich D., Hällberg B. M., Ludwig R., Divne C.: *Nature Comm.* 6, 7542 (2015).

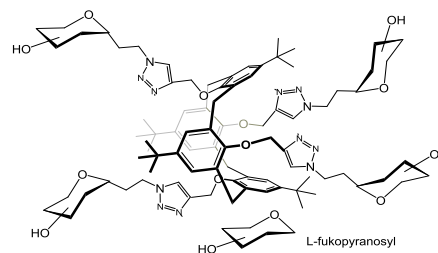
KALIXARENOVÁ GLYKOMIMETIKA

MARTINA KAŠÁKOVÁ^{a*}, LENKA MALINOVSKÁ^b, EVA DUBSKÁ^b, MICHAELA WIMMEROVÁ^b, JITKA MORAVCOVÁ^{a*}

^aVŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bCEITEC Masarykova Universita, Kamenice 5, 625 00 Brno
martina.kasakova@vscht.cz

V rozvoji řady životně důležitých dějů, jako je imunitní reakce, tvorba zánětů, virová a bakteriální infekce či rakovinné bujení, je klíčovým faktorem buněčná komunikace prostřednictvím reverzibilní interakce oligosacharidových řetězců glykokonjugátů a sacharid-vázajících proteinových receptorů (lektiny)¹. Přestože interakce sacharidů s lektiny vykazují určitou selektivitu, afinita samotné monovalentní interakce je obvykle slabá. Příroda tento problém kompenzuje tvz. glykoklastr efektem, kdy polyvalentní sacharidové ligandy interagují s lektinovým receptorem na více místech, a tím zajišťují silnější interakci a vyšší afinitu². Další překážkou, která brání výzkumu vysoce afinitních inhibitorů, je samotná *O*-glykosidová vazba oligosacharidového řetězce glykokonjugátu, která podléhá enzymové i chemické hydrolyze. Řešením tohoto problému je nahrazení *O*-glykosidové vazby stabilní vazbou *C*-glykosidovou.

Ve své práci se zaměřuji na zcela nové a vysoce stabilní multivalentní glykomimetika založená na kalixarenových strukturách. Byla vyvinuta syntéza výchozích 2-(glykopyranosyl)ethylamidů s *D*-galakto, *D*-manno a *L*-fuko konfigurací, které byly následně pomocí Huisgenovy cykloadiční adice zakotveny na di(tetra)propargyl-kalix[4]areny. Biologická afinita a selektivita nově připravených glykoklastrů byla otestována na lektinech patogenních bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepaciae*, *Ralstonia solanacea* a *Aspergillus fumigatus*. Nejvyšší afinita byla naměřena pro tetravalentní glykomimetika s 1,3-střídavou konformací kalix[4]arenu a *L*-fuko konfigurací *C*-sacharidu proti lektinu bakteriálního druhu *Ralstonia solanacea* a *Aspergillus fumigatus*.



Obr. 1

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR (15-17572S).

LITERATURA

1. Varki A.: *Glycobiology* 3, 97 (1993).
2. Lee Y. C., Lee R. T.: *Acc. Chem. Res.* 28, 321 (1995).

BIOKOMPATIBILNÍ POLYKAPROLAKTONOVÁ NANOVLÁKNA MODIFIKOVANÁ SERICINEM

MICHAELA KLOUČKOVÁ^a, VERONIKA SEDLÁKOVÁ^{a,b}, ZBYNĚK VORÁČ^c, PAVEL HYRŠL^d, LIBOR STREIT^e, JOSEF JAROŠ^a, DÁŠA DOLEŽALOVÁ^a, MILAN ALBERTI^c, ALEŠ HAMPL^a

^aÚstav histologie a embryologie LF MU, 625 00 Brno;
^bCentrum biomolekulárního a buněčného inženýrství ICRC, FNUSA, 656 91 Brno; ^cÚstav fyzikální elektroniky PŘF MU a ^dÚstav experimentální biologie PŘF MU, 611 37 Brno;
^eKlinika plastické a estetické chirurgie FNUSA, 612 00 Brno
klouckova@mail.muni.cz

Sericin je bioaktivní molekula izolovaná z kokonů bource morušového. Bylo prokázáno, že sericin má schopnost stimulovat proliferaci některých typů buněk a že disponuje antioxidantními a antimikrobiálními aktivitami¹. Díky těmto vlastnostem jej lze považovat za látku potenciálně vhodnou pro použití jako aditiva k polymerům pro vytváření buněčných nosičů pro regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství.

V naší práci jsme připravili nanovláknenné materiály na bázi polykaprolaktону modifikovaného různými koncentracemi sericinu, s cílem zlepšit jejich biokompatibilitu či bioaktivní vlastnosti. Nanomateriály byly připraveny metodou elektrospinningu s využitím technologie NanospiderTM. U takto modifikovaných nanomateriálů byly hodnoceny fyzikálně-chemické vlastnosti a následně i jejich vliv na chování buněk v *in vitro* kulturách. Pro odhalení detailní morfologie interakcí mezi buňkami a nosiči bylo využíváno především světelné mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Ke studiu vlivu sericinem modifikovaných nosičů na lidské buňky byly použity následující buněčné typy: lidské mesenchymální kmenové buňky izolované z lipoaspirátu a normální neurální progenitory diferencované *in vitro* z lidských embryonálních kmenových buněk.

Prokázali jsme, že přidavek sericinu do polykaprolaktónového nanovláknenného nosiče podporuje růst modelových buněk a také pozitivně ovlivňuje intimitu interakce mezi těmito buňkami a nanovláknenným materiálem. Tyto poznatky

otevřávají novou oblast vývoje biokompatibilních a bioaktivních buněčných nosičů pro využití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství.

Tato práce vznikla za podpory projektů EF pro regionální rozvoj - FNUSA-ICRC (č. CZ.1.05/1.1.00/02.0123) a Zdroje pro tkáňové inženýrství 5 a 6 (MUNI/A/1558/2014, MUNI/A/1352/2015) a také grantu GAČR (č. GJ15-18316Y).

LITERATURA

1. Sehnal F.: Entomol Res. 38, S1 (2008).

STEREOSELEKTIVNÍ SYNTÉZA DERIVÁTŮ OXAZINU NA PEVNÉ FÁZI

LEONA KOČMANOVÁ^a, JAN HLAVÁČ^{a,b}

^a Katedra organické chemie, PrF, UPOL, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^b Ústav molekulární a translační medicíny, LF, UPOL, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
kocmanova@orgchem.upol.cz

Hetero-Diels-Alderova reakce nitroso-sloučenin s dieny je užitečná metoda v syntéze přírodních molekul a biologicky aktivních látek¹. Katalytická enantioselektivní verze této reakce achirálních dienů s nitrosoaryly deriváty byla zkoumána v roztokové chemii². Jelikož stereoselektivní syntézy na pevné fázi nejsou obecně příliš popsány, zvolili jsme tuto reakci pro modelovou studii stereoselektivní syntézy na pevné fázi. Jako vhodné katalyzátory byly testovány různé bifenylové deriváty, které spolu s měďnými ionty a nitrosokupinovou substrátu tvoří stabilní komplexy umožňující přístup dienu preferenčně z jedné strany. Při optimalizaci byla pozornost soustředěna na parametry ovlivňující tvorbu tohoto intermediátu a jeho stabilitu. Pro studium byly zvoleny modelové substráty zahrnující kombinaci různých nitrosolátek generovaných *in-situ* a komerčně dostupných dienů (Schéma 1).

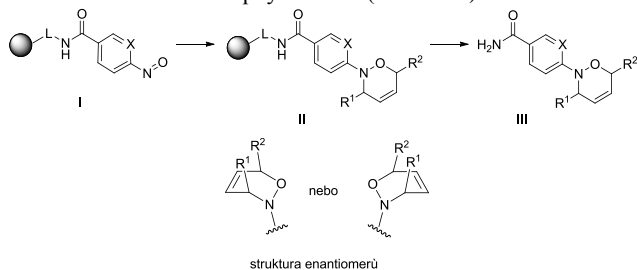


Schéma 1. Syntéza modelového derivátu oxazinu

Nezbytnou součástí práce bylo nalezení vhodných analytických podmínek chirální separace pro snadnou a rychlou identifikaci vzniklých enantiomerů⁴. Využity byly chirální HPLC a zejména pak SFC metody.

Nalezené podmínky budou dále využity pro syntézu biologicky aktivních látek, kdy je potřebný právě jeden enantiomer nebo kdy vliv konfigurace na biologickou aktivitu není znám.

Tato práce vznikla za podpory projektu Podpora udržitelnosti Ústavu molekulární a translační medicíny reg. č. LO1304.

LITERATURA

1. Harrison A., Melchionna M., Franco P., Hlavac J.: New J. Chem. 38, 5491 (2014).
2. Yamamoto Y., Yamamoto H. J.: Am. Chem. Soc. 126, 4128, (2004).
3. Krchňák V., Moellmann U., Dashe H. M., Miller M. J.: J. Comb. Chem., 10, 104, (2008).

FGF2 INDUKUJE MIGRÁCIU FIBROBLASTOV MLIEČNEJ ŽLAZY V 3D EXTRACELULÁRNEJ MATRIX

ZUZANA KOLEDOVÁ^{*}, ALEŠ HAMPL

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

Epitelovo-stromálne interakcie regulujú správny vývin a homeostázu orgánov a ich deregulácia vedie k vývojovým poruchám a nádorom. Signalizácia fibroblastového rastového faktoru (FGF) sprostredkuje epitelovo-stromálne interakcie behom vývoja vetvených orgánov. V mliečnej žľaze signalizácia FGF reguluje vetvenie epitelu a funkciu epitelových kmeňových buniek. Avšak úloha signalizácie FGF vo fibroblastoch strômy mliečnej žľazy nebola dosiaľ preštudovaná.

Naše výsledky ukazujú, že signalizácia FGF je funkčná v primárnych fibroblastoch mliečnej žľazy. Z testovaných faktorov rodiny FGF predovšetkým FGF2 zvyšuje proliferáciu, migráciu v 2D prostredí a matrix-remodelačnú aktivitu fibroblastov mliečnej žľazy. Navyše, signalizácia FGF2 indukuje invazívny fenotyp fibroblastov a ich migráciu v 3D extracelulárnej matrix (ECM).

Podrobnejšie štúdium FGF2-indukovanej invázie fibroblastov ukázalo, že je nezávislá na proliferácii fibroblastov a degradácii ECM a že primárnym mechanizmom invázie je kontrakcia aktíno-myozínového cytoskeletu. Kľúčovými regulačnými molekulami sú MLCK a malé GTPázy Rho, Rac1 a Cdc42, inhibícia ktorých zabránila FGF2-indukovanej migrácii v 3D kultúrach. Prekvapivo inhibícia ROCK či myozínu II indukovala masívnu inváziu fibroblastov do 3D ECM. Navyše inhibícia myozínu II viedla k zmene mechanizmu migrácie fibroblastov v 3D ECM z lamelopódného typu na amébovitý.

Súhrnne naše výsledky ukazujú novú úlohu FGF2 v regulácii interakcií fibroblastov s ECM, ktorá je kľúčová pre vývoj mliečnej žľazy, a odhaľujú signálne proteíny potrebné pre migráciu fibroblastov v 3D ECM.

Táto práca bola podporená z projektov CZ.1.07/2.3.00/30.0037 (ESF a štátny rozpočet ČR), „Juniorský výzkumník 2015“ (LF MUNI) a GJ16-20031Y (GAČR).

INHIBITORY CYSTEINOVÝCH PROTEAS PŘÍTOMNÝCH V KLÍŠTĚCÍCH SLINÁCH SPECIFICKY INHIBUJÍ DIFERENCIACI A FUNKCI IMUNITNÍCH BUNĚK

JAN KOTÁL^{a,b}, JINDŘICH CHMELÁŘ^b, MICHAEL
KOTSYFAKIS^a

^aBiologické centrum AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav,
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice; ^bPřírodovědecká
fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice
jankotal@gmail.com

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je významným přenašečem nemocí ve střední Evropě. Patogeny jsou do hostitele přeneseny spolu s klíštěcími slinami, které přenos usnadňují díky své imunomodulační aktivitě¹. Komplexní směs imunomodulačních látek, která se v klíštěcích slinách vyvinula jako adaptace na sání na hostiteli, tlumí jak vrozenou, tak získanou imunitu. Ty by jinak způsobily svědění a zánět v místě sání, který může vést až k poškození a odvrhnutí klíštěte². Jednu z proteinových rodin z klíštěcích slin tvoří cystatiny – inhibitory cysteinových proteas, které mimo jiné ovlivňují funkci antigen prezentujících buněk, migraci leukocytů do místa zánětu nebo apoptózu³. Několik cystatinů již bylo funkčně charakterizováno u jiných druhů klíšťat⁴, ale pro cystatiny z *I. ricinus* zatím žádná data nejsou.

V protiklíštěcí imunitě je zapojena buněčná i protilátková imunitní odpověď, zahrnující většinu druhů buněk imunitního systému^{2,5}. Tématem tohoto projektu je testování vlivu dvou klíštěcích cystatinů (Cys1 a Cys2) na funkci imunitních buněk. Studovali jsme ovlivnění produkce oxidu dusnatého makrofágy, který má silné protiparazitické účinky⁶. Zjistili jsme snížení produkce NO, a to přímo úměrně koncentraci obou cystatinů. Pomocí průtokové cytometrie jsme pozorovali vliv cystatinů na diferenciaci a maturaci makrofágů a dendritických buněk (DC) z prekurzorů kostní dřeně. Na povrchu DC byla výrazně snížena exprese integrinu CD11c, který hraje roli při fagocytóze, buněčné migraci nebo při aktivaci proliferace T lymfocytů⁷. Oba cystatiny také snižovaly expresi MHC II molekul sloužících k prezentaci antigenů dalším buňkám imunitního systému⁷. Cys1 snižoval proliferaci CD4+ T lymfocytů - při inkubaci se splenocyty stimulovanými concanavalinem A se snížilo procento CD4+ T lymfocytů, jenž přešly do stavu blastické transformace. Pluripotentní aktivita, pozorovaná u Cys1 i Cys2, odpovídá výsledkům s cystatiny z jiných klíštěcích druhů^{4,8,9}.

Uvedená pozorování naznačují, že studované cystatiny tlumí imunitní odpověď a mohly by hrát roli i při přenosu patogenů z klíštěte na hostitele. Zjištěná data mohou být využita při vývoji nových imunomodulačních léčiv nebo při vývoji vakcíny proti přenosu patogenů.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P502/12/2409 uděleného MK.

LITERATURA

1. Mehlhorn H.: *Encyclopedia of Parasitology*, 3. vyd., Springer Verlag (2008).

2. Francischetti I. M., Sa-Nunes A., Mans B. J., Santos I. M., Ribeiro J. M.: *Front. Biosci.* 14, 2051 (2009).
3. Reddy V. Y., Zhang Q. Y., Weiss S. J.: *PNAS* 92, 3849 (1995).
4. Schwarz A., Valdes J. J., Kotsyfakis M.: *Ticks Tick-borne Dis.* 3, 117 (2012).
5. Kotál J., Langhansová H., Lieskovská J., Andersen J. F., Francischetti I. M., Chavakis T., Kopecký J., Pedra J. H., Kotsyfakis M., Chmelář J.: *J. Proteomics* 128, 58 (2015).
6. James S. L.: *Microbial. Rev.* 59, 533 (1995).
7. Murphy K., Travers P., Walport M., Janeway C.: *Janeway's immunobiology*, 8. vyd., Garland Science (2012).
8. Horká H., Černá-Kýčková K., Skallová A., Kopecký J.: *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 373 (2009).
9. Kotsyfakis M., Sa-Nunes A., Francischetti I. M., Mather T. N., Andersen J. F., Ribeiro J. M.: *J. Biol. Chem.* 281, 26298 (2006).

ANAEROBNÍ OXIDACE SÍRY U EXTREMOFILNÍCH BAKTERIÍ

JÍŘÍ KUČERA*, EVA PAKOSTOVÁ, OLDŘICH
JANICZEK, MARTIN MANDL

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova
univerzita, Kollářská 2, 61137 Brno
jiri.kucera@mail.muni.cz

Významnou rolí extremofilních mikroorganismů je jejich schopnost oxidovat minerály obsahující síru a železo. Tato jejich vlastnost se uplatňuje nejen při spontánních biogeochemických pochodech v extrémně kyselém prostředí sulfidových minerálů, ale i při biotechnologické extrakci vzácných kovů pomocí oxidativního loužení. Chemolitoautotrofní bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* je vhodný metabolický model, neboť realizuje dané biochemické přeměny. U této fakultativně anaerobní bakterie byla zkoumána schopnost anaerobně oxidovat elementární síru spojená s redukcí Fe(III). Toho se nově využívá při biotechnologické extrakci kovů reduktivním loužením oxidovaných rud. V literatuře uváděná stechiometrie procesu nebyla v souladu se získanými výsledky s ohledem na intenzitu acidifikace prostředí. Návrh reálnější stechiometrie přineslo *in silico* reakční modelování za skutečných podmínek bakteriální aktivity, které ukázalo odlišnosti v účasti reaktantů i produktů¹. Navržená reakční rovnice nám umožnila přesnější predikci environmentální acidifikace během anaerobního procesu. Analýza proteomu poskytla vůbec první a širší nahlédnutí do fyziologie extremofilních bakterií během anaerobní oxidace síry díky identifikaci nových proteinů se vztahem k anaerobiose a překvapivě také elektronových přenašečů již dříve popsanych během aerobní oxidace Fe(II)². Transkripční profilování odhalilo anaerobní indukci genů s funkcí v aerobní oxidaci Fe(II) a síry. Během aerobního pasážování železitých buněk na síru byla pozorována ztráta schopnosti siřných pasáží anaerobně oxidovat síru díky neschopnosti redukovat Fe(III). Proteomická a transkriptomická studie u těchto pasážovaných kultur odhalila potlačení

exprese genů a proteinů dříve popsaných pouze v aerobní oxidaci Fe(II) a několika proteinů účastnících se oxidace síry a redukováných sírných látek³. Na základě dosavadních výsledků byl navržen model anaerobní dráhy oxidace síry. Důležitou roli v tomto modelu sehrávají složky železo-oxidujícího systému, které zřejmě i redukují Fe(III) a tak zůstávají základním biokatalytickým nástrojem důležitým nejen v aerobním, ale i v anaerobním prostředí.

Tato práce vznikla za podpory grantu GP14-27075P a MUNI/A/1265/2015.

LITERATURA

1. Kucera J., Zeman J., Mandl M., Cerna H.: A. Van Leeuw. J. Microb. *101*, 919 (2012).
2. Kucera J., Bouchal P., Cerna H., Potesil D., Janiczek O., Zdrahal Z., Mandl M.: A. Van Leeuw. J. Microb. *101*, 561 (2012).
3. Kucera J., Pakostova E., Janiczek O., Mandl M.: Adv. Mater. Res. *1130*, 97 (2015).

ÚLOHA THIOREDOXINU V REGULACI ASK1 KINASY

**SALOME KYLAROVÁ^{a,b}, DALIBOR KOŠEK^{a,b},
VERONIKA OBŠILOVÁ^b, TOMÁŠ OBŠIL^{a,b}**

*^aKatedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^bFyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Praha 4
salome.kylarova@fgu.cas.cz*

ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1) se řadí mezi členy rodiny mitogenem aktivovaných protein kinas (MAP3K), které fosforylací aktivují JNK a p38 MAPK signální dráhy v reakci na vnější podněty jako jsou oxidativní stres nebo endogenní faktory TNF a FasL. Její hlavní funkce je spjatá s aktivací apoptosy, čímž hraje důležitou roli v patogenezi mnoha onemocnění např. rakoviny nebo neurodegenerativních chorob. Mezi důležité regulátory funkce ASK1 se řadí i redoxní protein thioredoxin (Thrx). Vazba redukováného Thrx na ASK1 inhibuje její kinasovou aktivitu a zabraňuje tak přenosu signálu přes další členy apoptotické dráhy¹.

Naším hlavním zájmem je objasnit dosud neznámý mechanismus této inhibice na základě biofyzikální a strukturní charakterizace ASK1 a komplexu ASK1:Thrx. S využitím technik analytické ultracentrifugace, fluorescenční spektroskopie, cirkulárního dichroismu a SAXS jsme v nedávné studii ukázali, že ASK1 s Thrx vytváří stabilní komplex v poměru 1:1 a pro jejich vzájemnou interakci je esenciální katalytický motiv Thrx. Navíc vazba Thrx patrně nevyvolává žádné významné strukturní změny ASK1 a nezahrnuje tvorbu intermolekulárního disulfidu².

Znalost mechanismu i struktury komplexu ASK1:Thrx by mohla osvětlit narušený průběh těchto signálních drah a být tak podnětem pro jejich další studium jako možného cíle terapeutického zásahu.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR (Projekt 14-10061S) a výzkumného projektu RVO 67985823 Fyziologického ústavu AV ČR.

LITERATURA:

1. Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H.: EMBO J. *17*, 2596 (1998).
2. Kosek D., Kylarova S., Psenakova K., Rezabkova L., Herman P., Vecer J., Obsilova V., Obsil T.: J. Biol. Chem. *279*, 24463 (2014).

ÚLOHA M3-S2 LINKERŮ PRO FUNKČNÍ VLASTNOSTI NMDA RECEPTORU

**MAREK LADISLAV^a, JIŘÍ ČERNÝ^b, JAN KRŮŠEK^a,
LADISLAV VYKLICKÝ^a, ALEŠ BALÍK^a**

*^aFyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Praha; ^bBiotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., BIOCEV, Vestec
marek.ladislav@fgu.cas.cz*

Ionotropní glutamátové receptory (iGluR) zprostředkovávají excitační přenos v centrální nervové soustavě. Farmakologicky a funkčně lze odlišit čtyři podtypy iGluR – AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropanový), kainátový, NMDA (*N*-methyl-D-aspartátový) a δ receptor. Hlavním funkčním rozdílem mezi jednotlivými typy iGluR je způsob aktivace a kinetické parametry iontového kanálu, které určují jejich specifickou úlohu během synaptického přenosu signálu. Disfunkce NMDA receptoru je příčinou řady neurologických či psychiatrických onemocnění. Přesný mechanismus aktivace iontového kanálu není stále popsán, přestože je základním předpokladem pro pochopení fyziologických funkcí receptoru a změn provázejících jeho patofyziologické chování.

iGluR jsou proteinové komplexy lokalizované na buněčné membráně, skládající se ze čtyř podjednotek, které mají identickou doménovou organizaci. Na extracelulární straně se nachází N-terminální doména, na kterou navazuje ligand vázající doména (LBD), jež je dále spojena s transmembránovými helixy (TMD) tvořícími vlastní iontový kanál. LBD a TMD domény jsou propojeny třemi krátkými polypeptidovými řetězci tzv. linkery. Oproti AMPA/kainátovým receptorům se NMDAR nejčastěji skládá ze dvou obligatorních glycin vázajících (GluN1) a dvou glutamát vázajících podjednotek (GluN2A-D), jejichž koordinovanou aktivací dochází k otevření iontového kanálu.

Obecná představa mechanismu otevírání iontového kanálu předpokládá vazbu ligandu na jeho vazebné místo v LBD, která je doprovázena změnou konformace LBD. Tato strukturální změna se dále šíří směrem k TMD a ve svém důsledku vede k otevření kanálu. Současné poznatky ukazují na mechanické působení linkerů při převodu konformační energie z LBD na kanál, přičemž je zřejmé, že jejich neznámé biofyzikální vlastnosti spoluurčují míru tohoto převodu.

Z tohoto důvodu studujeme přímý vliv centrálního linkeru M3-S2 na proces otevírání kanálu. Tyto linkery jsou zodpovědné za pohyb M3 helixů, které tvoří vlastní iontové kanál. Pomocí cílené mutagenese a změn v délce linkeru jsme studovali jejich vliv na otevírání kanálu. Naše data ukazují, že funkční propojení LBD a TMD odlišných podjednotek se překvapivě výrazně liší, kdy GluN1 je velmi citlivá na přesné uspořádání linkeru, kdežto konformační přenos u GluN2 podjednotky probíhá kvalitativně stejně i s velmi modifikovaným linkerem. Toto tak potvrzuje současné mínění o odlišném významu podjednotek pro celkovou aktivaci iontového kanálu.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR P304/12/G069 a GA ČR P303/45/1464.

JEDNODUCHÉ DIFUZNÍ METODY PRO STUDIUM TRANSPORTU KAPALNÝCH HUMINOVÝCH PŘÍPRAVKŮ DO LISTŮ ROSTLIN

MARCELA LAŠTŮVKOVÁ^a, PETR SEDLÁČEK, JIŘÍ SMILEK, MARTINA KLUČÁKOVÁ

^aCentrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
xclastuvkova@fch.vutbr.cz

Huminové látky jsou nedílnou součástí půdy, které se vyznačují svými blahodárnými účinky na půdu i rostliny. Se vzrůstající populací na Zemi dochází stále více k vyčerpávání půd, které se podepisuje nejen na snižování výnosů, ale může dojít až k úplnému znehodnocení, které vede k přeměně na neúrodnou pouštinu. Proto jsou často huminové látky dodávány do půdy uměle, neboť díky jejich blahodárnému působení dochází ke zvýšení její produktivity, úrodnosti a soudržnosti (zamezení půdní erozi). Pozitivní vlivy těchto látek se taktéž projeví i na samotných rostlinách a z toho důvodu se začaly aplikovat spolu s dalšími přípravky podporujícími kvalitu půdy a rostlin v tuhé formě (NPK, granulace, tablety apod.) a následně také pomocí postřikovacích směsí. Tento typ aplikace, který nazýváme jako foliární hnojení, se stal jeden z nejvyužívanějších aplikačních procesů hnojení vůbec, neboť povrchem rostlin dochází k přijímání několikanásobně většího množství účinných látek, než je tomu v případě kořenové výživy.

Tento druh aplikace hnojiv a huminové látky se staly předmětem našeho zkoumání. Aby tyto látky mohly ovlivňovat fyziologii rostlin, musí nejdříve překonat tenkou vrstvu na povrchu rostlin nazývanou kutikula. Pro studium penetračních schopností těchto látek bylo nutné nejdříve provést izolace kutikul, kdy bylo využito dvou metod – enzymatická a chemická. Enzymatická metoda je založena na působení enzymů pektinasy a celulasy v citrátovém pufru, zatímco chemická izolace je založena na separaci tenkých částí listů působením chloridu zinečnatého v koncentrované kyselině chlorovodíkové. Takto získané membrány byly následně využity pro jednoduché transportní experimenty (ustálená a neustálená difuze), které byly sestaveny

z hydrogelových matic, simulujících přirozené prostředí huminových látek a navíc nám umožňují modelovat také prostředí listů.

Díky této metodě je možné stanovit množství látky prošlé do listu a zhodnotit, zdali aplikované množství není zbytečné v nadbytku nebo naopak nedostatku, který by rostlina pro svoji funkci potřebovala. Využitím této techniky by bylo dále možné stanovit optimální množství aplikovaného přípravku za různých environmentálních podmínek. Tato technika by navíc mohla minimalizovat nežádoucí dopady související s přehnojováním půd, které způsobuje jejich znehodnocení a navíc dochází ke kontaminaci pitných zdrojů vody.

Tato práce byla podpořena projektem REG Lo1211, Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT – udržitelnost a rozvoj (Národní program pro udržitelnost I, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy, Česká republika).

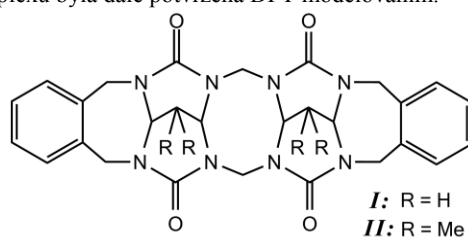
MOLEKULÁRNÍ KLIPSY DIMERU PROPANDIMOČOVINY

TOMÁŠ LÍZAL, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ*

Ústav chemie; Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
356810@mail.muni.cz

Propandimočovina je heterocyklická sloučenina odvozená od struktury glykolurilu. Jde o vhodný stavební blok pro přípravu supramolekulárních objektů jako jsou molekulární klipsy¹ a makrocycly².

V příspěvku popisujeme syntézu a vlastnosti nové molekulární klipsy dimeru *o*-xylylen propandimočoviny (obr. 1: **I**, **II**). Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR spektroskopie, hmotnostní spektrometrie a rentgenové strukturní analýzy. Bylo zjištěno, že molekulární klipsy mohou v nepolárním roztoku slabě vázat halidové ionty. Supramolekulární interakce mezi molekulárními klipsami a halidovými ionty byly studovány pomocí NMR titračních experimentů. Tyto interakce překvapivě probíhají mimo kavitu tvořenou *o*-xylylenovými skupinami. Anionty se místo toho vážou na opačné části dimeru propandimočoviny. Při studiu komplexů byla pozorována C-H...X⁻ vazba mezi methinovými protony hostitele a halidovými ionty. Geometrie komplexů byla dále potvrzena DFT modelováním.



Obr. 1. Molekulární klipsy dimeru *o*-xylylen propandimočoviny.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (13-15576S) a MŠMT ČR (LM2011028 a LO1214).

LITERATURA

1. Jansen R. J., Rowan A. E., de Gelder R., Scheeren H. W., Nolte R. J.: *Chem. Commun.* 1998, 121.
2. Ustrnul L., Kulhánek P., Lizal T., Šindelář V.: *Org. Lett.* 17, 1022 (2015).

**TRANSDIFERENCIACE NEENDOKRINNÍCH
PANKREATICKÝCH BUNĚK NA BUŇKY
PRODUKUJÍCÍ INSULIN POMOCÍ SYNTETICKÝCH
MEDIÁTOROVÝCH RNA**

**ŠÁRKA LOUKOTOVÁ^a, TOMÁŠ KOBLAS^a, IVAN
LEONTOVÝČ^a, LUCIE KOSINOVÁ^a, FRANTIŠEK
SAUDEK^a**

^aLaboratoř Langerhansových ostrůvků, Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha lous@ikem.cz

Transplantace insulin produkující tkáň je v současné době jediným efektivním způsobem léčby diabetu závislého na insulinu, avšak málo dostupným kvůli nedostatku lidských orgánových dárců. Alternativním zdrojem insulin produkující tkáň by mohly být buňky produkující insulin, získané řízenou přeměnou neendokrinních buněk pankreatu.

V současné době jsou pro řízenou přeměnu jednoho typu buňky na jiný využívány virové vektory, obsahující klíčové geny nezbytné pro změnu charakteru buňky. Avšak hlavním rizikem této metody je možnost integrace virové DNA do buněčného genomu. Z tohoto důvodu jsme použili zcela nový přístup dopravy genetické informace do buňky založený na aplikaci syntetické mRNA (syn-mRNA). Syn-mRNA umožňuje expresi klíčových transkripčních faktorů stimulujících transdiferenciaci neendokrinních pankreatických buněk na buňky produkující insulin, bez rizika integrace do buněčného genomu a vyvolání nádorového zvratu.

Syn-mRNA byla připravena *in vitro* transkripcí s využitím modifikovaných nukleotidů pseudouridin trifosfátu, 5-methylcytidinu a ARCA analogu 5'capičky za účelem snížení nespecifické imunitní odpovědi buňky. Pro transdiferenciaci byly použity syn-mRNA kódující pankreatické transkripční faktory Pdx1, Neurog3 a MafA.

Směs syn-mRNA byla testována na pankreatické exokrinní buněčné linii AR42J po dobu deseti dnů. Na základě analýzy genové exprese a imunofluorescenční detekce bylo prokázáno, že působení transkripčních faktorů jednak vyvolalo expresi obou genů pro insulin *Ins1* a *Ins2*, ale také byla stimulována exprese genů důležitých pro správnou funkci pankreatických β -buněk jako např. *Glut2*, *Sur1*, *Kir6.2*, *Pcsk1* a *Pcsk2*. S cílem zvýšit míru transdiferenciace byly buňky vystaveny působení epigenetického modulátoru 5-Aza-2'-deoxycytidinu po dobu tří dnů před zahájením transdiferenciace. Ošetřením buněk tímto epigenetickým modulátorem došlo ke zvýšenému počtu insulin produkujících buněk z $3,5 \pm 0,9\%$ na $14,3 \pm 1,9\%$ ($n=4$). Navíc transdiferenciované buňky byly schopné reagovat na změnu hladiny glukosy ($2,5$ mM vs. 20 mM glukosa) pomocí zvýšené sekrece insulinu do média (842 ± 72 vs. 1157 ± 58 pg insulinu/ μ g DNA/ml) ($n=4$).

Na základě našich výsledků předpokládáme, že transdiferenciace exokrinních buněk na insulin produkující buňky pomocí syn-mRNA kódující pankreatické transkripční faktory představuje slibný přístup pro buněčnou terapii diabetu.

Podpořeno MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ00023001“).

**THE ROLE OF ATOH1 AND NEUROD1
TRANSCRIPTION FACTORS IN INNER EAR
DEVELOPMENT**

**IVA MACOVA, ROMANA BOHUSLAVOVA,
TETYANA CHUMAK, JOSEF SYKA, BERND
FRITZSCH, GABRIELA PAVLINKOVA**

Institute of Biotechnology CAS, BIOCEV, Průmyslová 595,
252 42 Vestec; Charles University in Prague, Viničná 5,
128 44 Prague 2
Iva.Macova@ibt.cas.cz

The morphogenesis of inner ear is governed by the temporal and spatial expression of transcription factors. The objective of this project is to elucidate functional role of LIM-homeodomain protein *Islet1* and its possible cooperation with basic helix-loop-helix factors *Atoh1* and *Neurod1*. For this purpose, new mouse models with conditional deletion (CKO) *Atoh1* and/or *Neurod1* driven by *Islet1* expression were created. Inner ear morphology and hearing functions were compared between CKO mutants and wild type.

The results showed neither sensory hair cells nor supporting cells in the *Atoh1* CKO inner ear. As a consequence of missing epithelia, the innervation of all inner ear organs was significantly decreased. Although embryonic *Neurod1* CKO inner ears develop almost properly, functional tests revealed significant hearing deterioration in the adult mutant mice. Animals carrying the double mutation had no sensory cells and no supporting cells in the inner ear similarly to *Atoh1* CKO. However, the innervation pattern of *Atoh1/Neurod1* CKO inner ears was significantly different compared wild type or *Atoh1* CKO. The fiber network was condensed in the place of the missing epithelium with expanded loops.

In conclusion, transcription factor *Islet1* plays a key role in specification of all cells of inner ear – hair cells, supporting cells and neurons of sensory ganglion. *Atoh1* is an important protein for the formation of the sensory epithelia, whereas proneural factor *Neurod1* is necessary for survival of sensory neurons.

The study was supported by the Charles University (project GA UK No 324615), the CSD (#13-07996S) and by BIOCEV CZ.1.05/1.1.00/02.0109 from the ERDF.

FOTOINDUKOVANÁ METODA „CATCH AND RELEASE“ PRO BIOLOGICKÉ APLIKACE**DOMINIK MADEA, TOMÁŠ SLANINA, PETR KLÁN***Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie a RECETOX, Kamenice 5, 625 00 Brno
424151@mail.muni.cz*

„Click chemie“ je široce používaná metodika pro spojování molekul, např. peptidů, farmaceutik a fluorescenčních barviv¹. Její hlavní předností je bioortogonalita, protože výchozí látky, alkyne a azidy, nereagují s funkčními skupinami přítomnými v biologických systémech. Klasické provedení click reakce vyžaduje použití Cu^+ jako katalyzátoru. V. Popik a spolupracovníci² představili fotochemickou variantu, která využívá cyklopropanonu jako prekurzory pro napnuté alkyne. Fotochemicky generovaný alkyne poté podléhá click reakci v přítomnosti organických azidů. Není přítom potřeba žádného kovového katalyzátoru.

V návaznosti na práci V. Popika představujeme novou „Catch and Release“ strategii, jejímž cílem je fotoindukovaná click reakce a následné rozpojení dvou molekul. V prvním kroku je derivát cyklopropanonu transformován fotochemicky na příslušný cykloalkyn, který následně reaguje s *p*-hydroxyfenacyl (*p*HP) azidem za vzniku derivátu 1,2,3-triazolu (Schéma 1). *p*HP je fotoodstupitelná chránící skupina³, která umožňuje konjugát vzniklý v předchozím kroku rozštěpit. Protože substráty obou fotochemických reakcí absorbují záření různých vlnových délek, transformace jsou ortogonální.

Na základě tohoto funkčního mechanismu by bylo možné vytvářet konjugáty protilátka-léčivo, regulovat enzymatickou aktivitu, hybridizovat DNA nebo zkoumat buněčnou signalizaci.

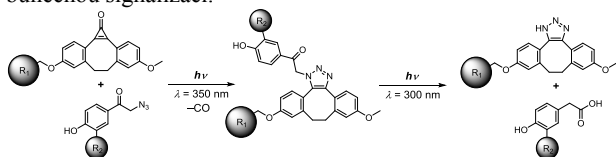


Schéma 1. Mechanismus „Catch and Release“ metody

LITERATURA

1. Kolb H. C., Sharpless K. B.: *Drug. Discov. Today*. 24, 1128 (2003).
2. Poloukhina A. A., Mbua N. E., Wolfert M. A., Boons G. J., Popik V. V.: *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15769 (2009).
3. Park C. H., Givens R. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2453 (1997).

FTALOCYANINY A JEJICH DUŠÍKATÉ IZOSTERY JAKO FOTOLENITIZÉRY VE FOTODYNAMICKÉ TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ – *IN VITRO* STUDIE**MILOSLAV MACHÁČEK*, VERONIKA NOVÁKOVÁ, PETR ZIMČÍK, TOMÁŠ ŠIMŮNEK***Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové
machamil@faf.cuni.cz*

Fotodynamická terapie nádorových onemocnění má tři základní stavební kameny: fotosenzitizér (PS), molekulární kyslík a světlo. Po inkubačním čase nutném k tomu, aby se PS dostal do nádorových buněk, je aplikováno červené světlo, které má nejvyšší prostupnost tkáněmi. PS je po absorpci světla excitován na vyšší energetický stav, ze kterého se dostává zpět do základního stavu emisí fotonu (tedy fluorescencí) a/nebo tvorbou reaktivních forem kyslíku. Způsob, jakým dojde k usmrcení buňky, závisí nejen na dávce světla a PS, ale také na struktuře PS a jeho lokalizaci uvnitř buňky. PS studované v této práci jsou hydrofilní a neagregující zinečnaté ftalocyaniny^{1,2} a jejich dusíkaté izostery – tetrapyrizinoporfyraziny^{1,3} a tetrapyrindoporfyraziny⁴ se silným absorpčním pásem kolem 780 nm. Fotodynamická aktivita látek byla sledována na několika nádorových buněčných liniích (HeLa, MCF-7, A549, HCT116, SK-MEL-28). Zjišťována byla i toxicita látek bez přítomnosti aktivujícího záření. Doba inkubace byla stanovena dle časového profilu vstupu látek do buněk. Bylo zjištěno, že studované PS jsou lokalizovány v endo-lysozomálním systému. Během aktivace světlem je lysozomální membrána poškozena, PS se šíří po celé buňce, dochází k poškození dalších buněčných struktur a k rychlé buněčné smrti. Ozáření červeným světlem ($\lambda > 570$ nm, 12,4 mW/cm², 11,2 J/cm²) indukuje silný fototoxický efekt již v nanomolárních koncentracích, zatímco toxicita PS bez přítomnosti aktivujícího světla zůstává velice nízká (stovky mikromolů).

Tato práce vznikla za podpory projektů Grantové agentury Univerzity Karlovy projekt č. 1916214 a Grantové agentury České republiky projekt č. 13-27761-S.

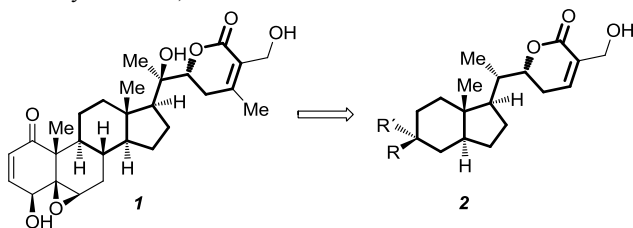
LITERATURA

1. Machacek M., Cidlina A., Novakova V., Svec J., Rudolf E., Miletin M., Kučera R., Simunek T., Zimcik P.: *J. Med. Chem.* 58, 4 (2015).
2. Makhseed S., Machacek M., Alfadly W., Tuhl A., Vinodh V., Simunek T., Novakova V., Kubat P., Rudolf E., Zimcik P.: *Chem. Comm.* 49, 95 (2013).
3. Machacek M., Kollár J., Miletin M., Kučera R., Kubat P., Simunek T., Novakova V., Zimcik P.: *RSC Adv.* 6 (2016).
4. Vachova L., Machacek M., Kucera R., Demuth J., Cermak P., Kopecky K., Miletin M., Jedlickova A., Simunek T., Novakova V., Zimcik P.: *Org. Biomol. Chem.* 13 (2015).

ANALOGY WHITANOLIDŮ JAKO INHIBITORY HEDGEHOG SIGNÁLNÍ DRÁHY**JAKUB ŠVENDA^a, LUKÁŠ MAIER^{b,c}, HERBERT WALDMANN^a**

^aMax-Planck Institute für Molekulare Physiologie, O.-Hahn-Strasse 11, 44227, Dortmund; ^bMasarykova Univerzita, Ústav chemie, 625 00, Brno; ^cMezinárodní centrum klinického výzkumu – FN u sv. Anny v Brně, 656 91 Brno
lmaier@mail.muni.cz

Withaferin A **1** je jedním z členů skupiny přírodních látek – whitanolidů¹, které vykazují širokou škálu biologických aktivit (např. inhibice angiogeneze² a regulace růstu nervových buněk³).



V této práci byla připravena knihovna strukturně zjednodušených analogů (**2**), kde je zachován centrální *trans*-hydrindanový motiv a dehydro- δ -laktonová část. Pomocí buněčných testů (na linii myších embryonálních fibroblastů) byl identifikován nový potentní a necytotoxický inhibitor signální dráhy Hedgehog (Hh). Podrobnější biologické studie inhibitoru pomohli odhalit pravděpodobný molekulární mechanismus: inhibice Smo (transmembránový receptor, zahrnutý v signální dráze Hh) s hodnotami $K_i = 57 \pm 10$ nM (cit.⁴). Hh signální dráha hraje klíčovou roli v embryonálním vývoji a její nežádoucí aktivace je spojována s některými typy rakovinných onemocnění (bazální nádor kůže, medulloblastom). Modulace Hh pomocí malých organických molekul může vést k lepšímu pochopení funkce této signální dráhy a souvislosti s některými typy nádorových onemocnění.

Tato práce vznikla za podpory grantů: FP7/2007-2013(ERC Grant 268309); Alexander von Humboldt Foundation, and FNUSA-ICRC (CZ.1.05/1.1.00/02.0123).

LITERATURA

- Chen L. X., He H., Qiu F.: Nat. Prod. Rep. 28, 705 (2011).
- Mohan R., Hammers H., Bargagna P., Zhan X., Herbstritt C., Ruiz A., Zhang L., Hanson A. D., Pribluda V.: Angiogenesis 7, 115 (2004).
- Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K.: Eur. J. Neurosci. 23, 1417 (2006).
- Švenda J., Sheremet M., Kremer L., Maier L., Bauer J. O., Strohmann C., Ziegler S., Kumar K., Waldmann H.: Ang. Chem. Int. Ed. 54, 5596 (2015).

ELEKTROZVLÁKNĚNÁ NANOVLÁKNA POKRYTÁ PLAZMOVÝM KOPOLYMEREM MALINANHYDRIDU A ACETYLENU

MIROSLAV MICHLIČEK^{a,b}, ANTON MANKHOV^b, EVA KEDROŇOVÁ^{a,b,c}, LENKA ZAJÍČKOVÁ^{a,b}

^aRG Plazmové technologie, CEITEC a ^bÚstav fyzikální elektroniky, PřF, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ^cÚstav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
michlicekm@gmail.com

Elektrozvlákněná nanovláknna vykazují analogickou architekturu k přirozenému prostředí tkáně ve fyzické struktuře i biologické funkci. Tudiž nanovláknna zvlákněná z biodegradabilních polymerů jako je polykaprolakton (PCL) mají značný potenciál pro tkáňové inženýrství nebo jako nosiče léčiv¹. Nicméně hydrofobní charakter polykaprolaktonu značně snižuje biokompatibilitu nanovláken, a tedy je třeba modifikovat povrch nanovláken za účelem zvýšení smáčivosti zavedením polárních funkčních skupin (karboxylové, aminové, anhydridové...)².

Plazmová depozice funkčních vrstev je pro tento účel výhodná metoda, neboť umožňuje úpravu povrchového složení a morfologie materiálu bez ovlivnění jeho objemových vlastností. V prezentované práci byla provedena depozice reaktivních karboxylových a anhydridových skupin kopolymerací maleinanhydridu a acetyleny v dielektrickém bariérovém výboji (DBD) za atmosférického tlaku. Výboj byl zapálen v opticky homogenním módu³, aby bylo možno dosáhnout homogenní depozice a minimalizovalo se poškození tepelně citlivého substrátu z PCL nanovláken.

Za optimalizovaných podmínek DBD umožnil depozici stabilních vrstev na PCL nanovláknna v celém objemu substrátu, přičemž struktura nanovláken nebyla poškozena. Anhydridové skupiny byly chemicky derivatizovány trifluorethylaminem. Následně byla zkoumána homogenita plazmové depozice pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a mapovací spektroskopie sekundárních iontů (SIMS). Chemické vlastnosti vrstvy byly zkoumány Fourierovskými transformovanou infračervenou spektroskopií (FTIR) a rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS). Byla určena koncentrace deponovaných anhydridových skupin až 8,3 skupin na 100 atomů uhlíku.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR, projektem CEITEC 2020 (LQ1601) a grant SCOPES IZ73Z0_152661 uděleným Swiss National Science Foundation. Miroslav Michlíček je stipendista programu Brno Ph.D. talent - financuje statutární město Brno.

LITERATURA

- Yan D., Jones J., Yuan X. Y., Xu X. H., Sheng J., Lee J. C.-M., Ma G. Q., Yu Q. S.: J. Biomed. Mater. Res. - Part A 101, 963 (2013).
- Siow K., Britcher L., Kumar S., Griesser H. J.: Plasma Process. Polym. 6-7, 392 (2006).
- Eliáš M., Kloc P., Jašek O., Mazánková V., Trunec D., Hrdy R., Zajíčková L.: J. Appl. Phys. 117, 103301 (2015).

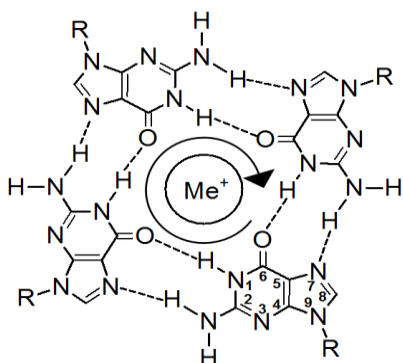
POROVNÁNÍ VLIVU (DEOXY)RIBOSOVÉHO REZIDUA NA TVORBU GUANINOVÝCH TETRÁD

PETER MOJZEŠ, VÁCLAV ŘÍMAL, KATEŘINA MUDROŇOVÁ

Fyzikální ústav MFF UK, 121 16 Praha
Katerina.Mudronova@gmail.com

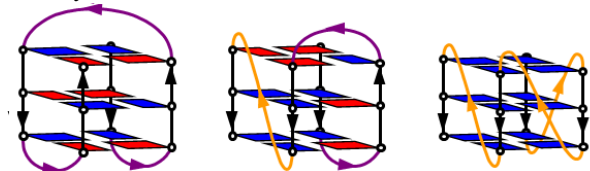
Nukleové kyseliny jsou velice důležitou a zajímavou třídou biomolekul, na kterých závisí existence života na Zemi. Kromě běžně známé dvoušroubovice tvoří nukleové kyseliny také vlásenky, i-motivy, triplexy či kvadruplexy. Každá z těchto struktur má svůj biologický význam a studium jejich vzniku, strukturních a konformačních vlastností je důležité pro pochopení řízení přenosu genetické informace.

Guaninové kvartety (G-kvartety) obsahují čtyři guaniny vzájemně symetricky propojené Hoogsteenovými vodíkovými můstky, jsou známe od 60. let minulého století a nedlouho poté bylo zjištěno, že mají velký biologický význam. Vyskytují se například v očích hlubokomořských ryb, kterým v extrémních podmínkách pomáhají ostřit, nebo v guanocytech některých pavouků, kteří pomocí nich dokáží měnit barvu svého těla¹.



Obr. 1. G-kvartet: čtyři guaniny vázané vodíkovými můstky a stabilizované vhodným kationtem

Jsou-li G-kvartety vytvářeny sekvencí nukleové kyseliny a jsou-li vázány vertikálním stohováním, hovoříme o G-kvadruplexech. Tyto sekvence se vyskytují v telomerních úsecích DNA, v oblastech promotorů genů a dalších klíčových regiorech DNA. Tyto kvadruplexy mají nejen ochrannou funkci při replikaci, ale hrají rovněž důležitou roli při regulaci genové exprese a míra jejich stability ovlivňuje řadu závažných onemocnění²⁻⁵.



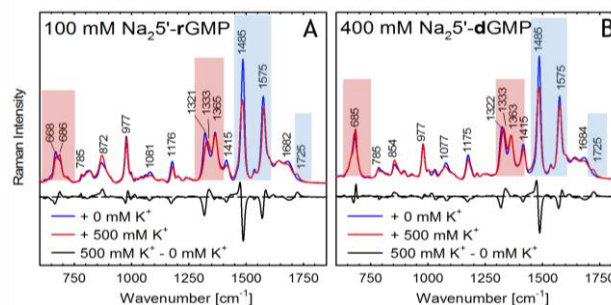
Obr. 2. Různé konformace G-kvadruplexu - antiparalelní, "3+1" hybridní a paralelní struktura

G-kvartety, ať tvořené jednotlivými mononukleotidy, dinukleotidy nebo oligonukleotidy, musí být stabilizovány vhodným kationtem, který se může nacházet v prostoru mezi jednotlivými kvartety nebo také v jejich rovině. Guaniny účastníci se párování v G-kvartetu mohou pocházet z různých částí téhož řetězce nebo z různých řetězců, a tím je dána velká strukturní rozmanitost a bohatá topologie kvadruplexových struktur⁴.

Základním kamenem, který stojí za pochopením samoasociace oligo- a polynukleotidů, je studium G-kvartetů. V této studii jsme se zabývali vlivem (deoxy)ribosového

rezidua na tvorbu tetrad rGMP a dGMP (guanosin monofosfát vs. deoxyguanosin monofosfát). Doposud totiž nebyl proveden žádný systematický výzkum vlivu této skupiny na konformaci supramolekulárních struktur.

Ukázalo se, že i když jsou si obě molekuly strukturně velice blízké, schopnost formovat tetrady se zásadně liší. Pomocí markerů stanovených v předchozí studii⁴ jsme byli schopni sledovat nejen rozdíly v koncentraci tetrad, ale též v konformaci samotných molekul, které jsou součástí tetrady. Domníváme se, že odlišná schopnost DNA a RNA tvořit kvadruplexy souvisí kromě jiných faktorů z velké části i s rozdílem mezi rGMP a dGMP.



Graf 1. Ramanova spektra rGMP a dGMP a spektrální pásy vypovídající o konformaci molekul

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR 15-06785S a GA UK 388615.

LITERATURA

1. Davis J. T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 43, 668 (2004).
2. Ilyinsky N. S., Varizhuk A. M., Beniaminov A. D., Puzanov M. A., Shchyolkina A. K., Kaluzhny D. N.: *Mol. Biol.* 48, 778 (2014).
3. Kiran K. G., Palaniswamy M.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1329 (2015).
4. Palacký J., Vorlíčková M., Kejnovská I., Mojžeš P.: *Nucl. Acids Res.* 41, 1005 (2013).
5. Gaetano C. M., Mihailescu M. R.: *Biophys. J.* 108, 236A (2015).
6. Mudroňová K., Římal V., Mojžeš P.: *Vib. Spectrosc.* 82, 60 (2016).

ÚLOHA microRNA-150 V PROGNÓZE A TRANSFORMACI FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU

KATEŘINA MUSILOVÁ^{a,b,*}, ANDREA JANÍKOVÁ^b, MAREK MRÁZ^{a,b,*}

^aCEITEC MU, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bCMBGT IHOK FN Brno a LF MU, Černopolní 9, 613 00 Brno
musilova.kate@gmail.com, marek.mraz@email.cz

Folikulární lymfom (FL) je druhým nejčastějším ne-Hodgkinským B-buněčným lymfomem. Klinický průběh FL je variabilní, ale jednoznačně nepříznivou událostí ve vývoji FL je jeho transformace do difuzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL), což je spojeno s vysokou mortalitou.

V projektu jsme se zaměřili na studium microRNA (miRNA), které souvisí s agresivitou FL a jeho transformací do DLBCL. V poslední době se ukazuje, že miRNA mají zásadní význam v patogenezi lymfomů a dalších malignit jako důležité post-transkripční regulátory genové exprese¹.

V naší práci jsme provedli analýzu exprese 380 miRNA u 16 vzorků pacientů s FL transformujícím do DLBCL (8 párů). Identifikovali jsme statisticky významné změny exprese 6 miRNA. Nejvýraznější změnou byl pokles exprese miR-150 (~5×) a také jsme detegovali významně nižší hladiny miR-150 v *de novo* DLBCL oproti FL. Nízká exprese miR-150 byla asociována s kratším celkovým přežíváním FL pacientů v našem souboru (n=89, medián přežití 6,2 let vs. nedosaženo, $P=0,007$). Nižší hladiny miR-150 byly pozorovány u pacientů s vyšší proliferací (Ki67>20 %; $P=0,003$) a vyšším rizikovým skóre FLIPI (3-5; $P=0,03$). Zjistili jsme, že miR-150 reguluje v maligních B-buňkách hladiny proteinu FOXP1. Bylo opakovaně popsáno, že vysoké hladiny FOXP1 asociují s agresivitou B-buněčných lymfomů a naše pozorování potenciálně objasňují mechanismus regulace FOXP1 pomocí miR-150. Ukázali jsme, že FOXP1 a miR-150 řídí aktivitu signální dráhy B-buněčného receptoru (BCR) v kontextu interakcí v nádorovém mikroprostředí, což potenciálně poprvé objasňuje význam těchto molekul v biologii B-buněčných lymfomů.

Naše výsledky ukazují, že miR-150 hraje důležitou úlohu v patofyziologii FL a může sloužit jako prognostický marker. Dále pracujeme na objasnění toho, do jaké míry může být snížení hladiny miR-150 kauzální pro agresivitu FL, resp. transformaci FL do DLBCL.

Podpořeno: GAČR (GA16-13334Y); AZV MZ ČR (16-29622A); TAČR (TE02000058/2014-2019); SoMoPro II – no. 4SGA8684 (ko-financováno Evropskou unií a Jihomoravským krajem); EHA Fellowship award; MŠMT ČR, grant LD15144 (COST CZ); MUNI/A/1028/2015; MŠMT ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601)

LITERATURA

1. Musilova K., Mraz M.: *Leukemia* 29, 5 (2015).

NOVÉ HYDROGELY NA BÁZI ROSTLINNÉ PRYSKYŘICE PRO REGENERACI MĚKKÝCH TKÁNÍ: PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE

EVA NEDOMOVÁ^a, LUCY VOJTOVÁ^{a,b}, JOSEF JANČÁŘ^{a,b}

^aCEITEC - Středoevropský technologický institut VUT, Technická 3058/10, 616 00 Brno; ^bSCITEG, a.s., ČR
Eva.Nedomova@ceitec.vutbr.cz

Lidská kůže představuje komplexní biologický systém chránící hlouběji uložené tkáně, regulující tělesnou teplotu, zabraňující ztrátě tekutin a absorbující některé léky. Při porušení této ochranné bariéry, např. popálením, je funkce této bariéry porušena a pro rychlejší hojení se používají hydrogely. Mezi další výhody použití hydrogelů na hojení

kůže patří bezbolestné odstranění obvazu, aniž by se poškodila nově vytvořená tkáň, méně jizev, jejich propustnost pro kyslík nebo kontrolovatelné dávkování léčiv. Hydrogely mohou být připraveny ze syntetických nebo přírodních polymerů, avšak přírodní polymery, mezi které patří rostlinné polysacharidy, vykazují vyšší biokompatibilitu, biodegradabilitu a obsahují biologicky rozeznatelné skupiny podporující buněčnou aktivitu.

V naší práci jsme se zaměřili na přípravu nových hydrogelových filmů pro vlhké hojení ran (např. popálenin). Cílem bylo vyvinout hydrolyticky stabilní hydrogely obsahující rostlinné polysacharidy s hojivými vlastnostmi, které budou cenově dostupné a s možností regulace jejich stability (degradace) množstvím přidaných aditiv.

Elastické transparentní hydrogely byly úspěšně připraveny z přírodní rostlinné pryskyřice stromu *Sterculia Urens*, jejichž mechanické vlastnosti byly vylepšeny přidáním syntetického polymeru. Z připravených směsí o různých poměrech obou polymerů a s různými koncentracemi síťovadla byly připraveny hydrogelové filmy a analyzovány pomocí chemicko-fyzikálních metod FTIR a TGA. Dále byla testována botnací schopnost filmů ve vodě, kde bylo ověřeno, že s vyšším přírůstkem síťovadla botnací schopnost hydrogelů klesá a lze tedy kontrolovaně nastavit sorpci vody. Kromě tohoto parametru byla dále sledována degradace hydrogelových filmů, která je důležitým parametrem pro následné použití materiálu. Bylo zjištěno, že rychlost degradace je závislá na poměru přírodní pryskyřice ku syntetickému polymeru a na koncentraci síťovadla. Vzorky s vyšším obsahem pryskyřice a nižší koncentrací síťovadla degradují rychleji, což je způsobeno rozrušováním intramolekulárních interakcí.

Připravené hydrogelové filmy byly také testovány na viabilitu 3T3 buněk s výsledkem prokazujícím vhodnost použití těchto materiálů pro regenerativní medicínu.

Tento výzkum byl finančně podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601).

EXTREMELY LONG AROMATICS: DIASTEREOMERICALLY PURE [19] HELICENE

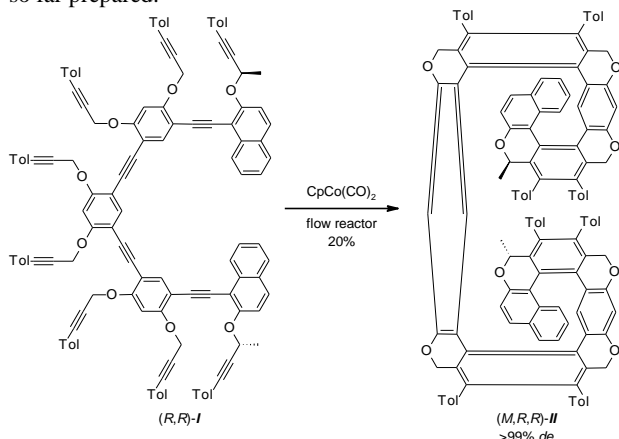
JINDŘICH NEJEDLÝ*, JIŘÍ RYBÁČEK, IRENA G. STARÁ*, IVO STARÝ*

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR
Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6
nejedly@uochb.cas.cz*

Electron transport through single molecules, especially chiral ones, has recently attracted a great interest of the scientific community. It has also been envisaged that further physical phenomena, such as electrical magneto-chiral anisotropy or spin-polarized transport, might be enhanced by increasing number of the fused rings of a polycyclic aromatic system. The lack of the easily accessible long nonracemic

helically chiral molecules led to the quest for efficient methodologies for their preparation.

Here, we report on the synthesis of the extremely long (*M,R,R*)-[19]helicene **II** containing the 2*H*-pyran rings (Scheme 1). The key synthetic step is a quadruple diastereoselective [2+2+2] cycloisomerization of the starting (*R,R*)-dodecayne **I** mediated by Ni(0) or Co(I) complexes. Stemming from the methodology developed in our laboratory,¹ the two stereogenic centers in the linear oligoynes steered the helical folding in such a way that the final (*M,R,R*)-[19]helicene **II** was obtained in an enantiomerically and diastereomerically pure form. It represents the longest helicene so far prepared.



Scheme 1.

This work was supported by the Czech Science Foundation (Reg. No. 16-08294S) and IOCB ASCR (RVO: 61388963).

REFERENCES

- Žádný J., Jančařík A., Andronova A., Šámal M., Vacek Chocholoušová J., Vacek J., Pohl R., Šaman D., Čiřáková I., Stará I. G., Starý I.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 5857 (2012).

STUDIUM SORPCE IONTŮ NA π -SYSTÉM V SOLVENTU ZA PŮSOBENÍ ELEKTRICKÉHO POLE METODAMI KVANTOVÉ CHEMIE

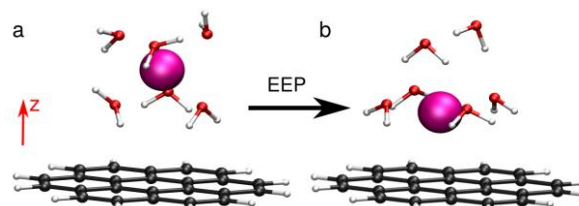
MARTIN NOVÁK, CINA FOROUTAN-NEJAD, RADEK MAREK

CEITEC – Středoevropský Technologický Institut, Masarykova Univerzita, Kamenice 5/A4, 625 00, Brno martin.novak@ceitec.muni.cz

Grafen je materiál, který díky svým unikátním fyzikálním a chemickým vlastnostem přitahuje stále větší pozornost. Uplatnění těchto vlastností je možné například v nové generaci baterií či kondenzátorů. V nich typicky dochází k sorpci nabitých částic na povrch grafenu.

Cílem této studie je popis interakcí mezi monovalentními ionty, kationty alkalických kovů a halogenidy, a π -systémem grafenu. Aromatický povrch receptoru je reprezentován

molekulou koronenu. Ke studiu byla využita metoda teorie funkcionálu hustoty (DFT) a následně byla provedena analýza elektronové hustoty a vertikálních excitačních energií. Model byl „ponořen“ do implicitního rozpouštědla s vlastnostmi vody. Externí homogenní elektrické pole (EEP) bylo aplikováno tak, aby posílilo nebo naopak oslabilo interakci iont- π systém.



Obr. 1. Externí elektrické pole indukuje zhoršení první solvatační sféry kationtu Li^+ . a) $\text{EEPz} = 0$ a.u. b) $\text{EEPz} = +0,01$ a.u.

Disociační a asociační děje jsou v implicitním solventu fundamentálně odlišné od vakua, v němž dochází k plynulé sorpci iontů na π -systém. V solventu byly při těchto dějích pozorovány diskontinuity, obzvláště u „tvrdých“ iontů, Li^+ a F^- . Náhlé změny ve vzdálenosti iont- π a v interakční energii (IE) byly přisouzeny rozpadu/reorganizaci první solvatační sféry při kritické hodnotě EEP, odlišné u různých iontů. Implicitní solvent predikuje různou velikost EEP, při níž dochází k asociaci resp. disociaci téhož iontu. Tato hypotéza je podpořena výpočty, v nichž jsou ionty při adsorpci obaleny šesti molekulami vody. U tvrdších iontů dochází ke kolapsu solvatační vrstvy při vyšších hodnotách EEP.

Analýza vertikálních excitačních elektronických stavů v souladu s delokalizačním indexem (DI) Kvantové Teorie „Atomů v Molekulách“ (QTAIM) ukazuje na odlišnou míru klasické a kvantové stabilizace vazeb aniont- π vs kationt- π .

Z metodologického hlediska je překvapivé, že implicitní solvent, tzn. nestrukturované pole obalující daný systém, dokáže zachytit jemně rozdíl v chování iontů pochopitelné chemickou intuící. Prezentované závěry pomohou pochopit mechanismy sorpce iontů na aromatický povrch grafenu na atomární úrovni a mohou pomoci k racionálnímu návrhu pokročilých elektronických součástek s lepšími vlastnostmi.

IMOBILIZOVANÉ IMIDAZOLIDIN-4-THIONY JAKO RECYKLOVATELNÉ ENANTIOSELEKTIVNÍ KATALYZÁTORY PRO HENRYHO REAKCI

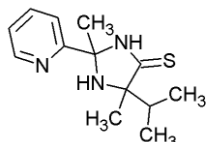
GABRIELA NOVÁKOVÁ, PAVEL DRABINA, MILOŠ SEDLÁK

Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice Gabriela.Novakova@student.upce.cz

Produkt asymetrické Henryho reakce je substituovaný chirální neracemický β -nitroalkohol, který lze dále použít pro přípravu farmaceutických substancí, u kterých je optická čistota důležitým faktorem¹. Asymetrickou Henryho reakci lze katalyzovat různými typy kovových chirálních komplexů,

přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo v případě použití měďnatých komplexů². Jedná se převážně o homogenní katalyzátory, které jsou po reakci špatně separovatelné z reakční směsi. Trendem posledních let je snaha tyto katalyzátory imobilizovat ukotvením například na heterogenní nosiče, a to nejen z důvodu snadné separovatelnosti, ale také možnosti opětovného použití katalyzátoru³.

Cílem této práce bylo provést imobilizaci měďnatého komplexu substituovaného 2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-onu, účinného enantioselektivního katalyzátoru², na polymerní nosič. Imobilizace spočívala ve strukturální modifikaci ligandu – nahrazení atomu kyslíku v imidazolidin-4-onovém cyklu za atom síry. U měďnatého komplexu nově vzniklého ligandu byla prokázána srovnatelná enantioselektivita jako u kyslíkatého analogu (~90 % ee).



Obr. 1. Nově připravený ligand 5-isopropyl-2,5-dimethyl-2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-thion

Dále byly připraveny katalyzátory ukotvené na polymerní nosiče – různé typy botnavých chlormethylovaných polystyrenů, u nichž byla studována enantioselektivita, možnost separace a jejich recyklace. Enantioselektivita imobilizovaných katalyzátorů byla v porovnání s homogenním srovnatelná, a lze je mnohonásobně recyklovat. Jsou proto ekonomicky i ekologicky výhodnější formou katalyzátoru.

LITERATURA

1. Kureshy R. I., Dangi B., Das A., Khan N. H., Abdi S. H. R., Bajaj H. C.: *Appl. Catal. A Gen.* 439–440, 74 (2012).
2. Panov I., Drabina P., Padělková Z., Šimůnek P., Sedlář M.: *J. Org. Chem.* 76, 4787 (2011).
3. Benaglia M., v *Recoverable and Recyclable Catalysts*, kap. 11., s. 301, J. Wiley, Wiltshire 2009.

INTERAKCE B LYMFOCYTŮ S MIKROPROSTŘEDÍM VEDOU KE ZVÝŠENÉ EXPRESI CD20 PŘES AKTIVACI DRÁHY CXCR4/SDF-1: VÝZNAM PRO LÉČBU PACIENTŮ S B BUNĚČNOU LEUKÉMIÍ

GABRIELA PAVLASOVÁ^{a,b,*}, MAREK BORSKÝ^b, JENNIFER R. BROWN^c, ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ^{a,b}, MAREK MRÁZ^{a,b,*}

^aCEITEC MU, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bCMBGT IHOK FN Brno a LF MU, Černopolní 9, 613 00 Brno, ^cDept. of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, 450 Brookline Ave Boston, MA, USA
gabkapvaslova@gmail.com, marek.mraz@email.cz

V léčbě B buněčných leukémií a lymfomů se v současnosti jako velmi slibná jeví terapie pomocí inhibitorů signální dráhy B buněčného receptoru (BCR; např. ibrutinib) a jsou zvažovány

kombinace s monoklonálními protilátkami (mAb) anti-CD20 (např. rituximab). Inhibitory BCR přerušují interakci maligních B buněk s nádorovým mikroprostředím lymfatických uzlin a kostní dřevě a indukují jejich mobilizaci do periferní krve, čímž je činí přístupnější pro mAb. V naší studii jsme však zjistili, že podávání ibrutinibu *in vivo* vede u maligních B buněk pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) k poklesu hladiny CD20 ($p < 0,0001$), což je molekula cílená většinou mAb využívaných v terapii B buněčných malignit. Také to ukazuje, že CD20 může být regulováno dosud neznámým mechanismem v mikroprostředí.

Analýzovali jsme subpopulace primárních CLL buněk rozlišené na základě povrchové exprese CD5 a CXCR4. Nízké hladiny chemokinového receptoru CXCR4 a vysoká exprese aktivačního markeru CD5 charakterizuje CLL buňky, které teprve v nedávné době opustily mikroprostředí a jsou jim tedy nejvíce ovlivněny (CXCR4^{dim}CD5^{bright}). Tato subpopulace CLL buněk vykazovala vyšší hladiny CD20 a to jak na buněčném povrchu, tak i na úrovni mRNA ($P < 0,01$). Následně jsme ko-kultivovali primární CLL buňky se stromálními buňkami kostní dřevě (HS-5) a pozorovali, že ko-kultivované CLL buňky měly vyšší hladinu CD20 než kontrolní buňky kultivované na plastiku ($P = 0,01$) a že přidání ibrutinibu tuto up-regulaci CD20 inhibovalo ($P < 0,05$).

Následně jsme identifikovali přesnou molekulární dráhu zodpovědnou za tyto efekty. Ukázali jsme, že ligand receptoru CXCR4 – chemokin SDF-1 α indukuje zvýšení exprese CD20 ($P < 0,05$). Naopak aplikace inhibitoru CXCR4, plerixaforu nebo ibrutinibu potlačila změny v expresi CD20 indukované SDF-1.

V této studii jsme poprvé ukázali, že interakce mikroprostředí s CLL buňkami vede ke zvýšené expresi CD20. Popsali jsme první známý mechanismus regulace CD20 u maligních B buněk, což má významné důsledky pro kombinační léčbu pacientů.

Podpořeno: GAČR (GA16-13334Y), AZV MZ ČR (16-29622A), TAČR (TE02000058/2014-2019; SoMoPro II – no. 4SGA8684 (ko-financováno EU a JM krajem); EHA Fellowship award; MŠMT ČR, grant LD15144 (COST CZ); MUNIA/1028/2015; MŠMT ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601); G.P. je podporována městem Ostrava.

FOTOAKTIVNÍ KONJUGÁT NANDROLONU PRO ZOBRAZOVÁNÍ ŽIVÝCH BUNĚK A FOTODYNAMICKOU TERAPII

VLADIMÍRA PAVLÍČKOVÁ^a, SILVIE RIMPELOVÁ^a, MICHAL JURÁŠEK^b, KAMIL ZÁRUBA^c, OLDŘICH LAPČÍK^b, PAVEL DRAŠAR^b, TOMÁŠ RUML^a

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, ^bÚstav chemie přírodních látek, ^cÚstav analytické chemie; Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha
tomas.ruml@vscht.cz

Vývoj nových, méně invazivních a zároveň vysoce účinných metod léčby karcinomů je předmětem mnohých studií posledních let. Mezi dlouhodobě využívané metody léčby nenádorových i nádorových onemocnění patří

fyzická terapie (PDT). Ta využívá fotosenzitivních látek, tzv. fotosenzitizérů (PS), které po aktivaci světlem generují v přítomnosti molekulárního kyslíku jeho vysoce toxické reaktivní formy (reaktivní kyslíkové částice a singletový kyslík). Jejich vlivem je v buňce spuštěn proces apoptózy, díky čemuž dochází ke zničení nádoru. Hlavním úkolem ve vývoji poslední generace PS je zajištění selektivního cílení do nádorové tkáně. Toho je obvykle dosaženo spojením PS s molekulou přenašeče, tím mohou být např. protilátky, lipoproteiny, steroidy či nanočástice. Námí studovaný konjugát vznikl spojením přírodního PS, feoforbidu s anabolickým androgenním steroidem nandrolonem. Steroidní část konjugátu zajišťuje jeho cílení do buněk produkujících androgenní receptor (AR). Ten má nezastupitelnou roli v celé řadě fyziologických procesů, jeho nadprodukce však bývá často spojována s karcinomy prostaty.

Cílem práce bylo ověřit fototoxické účinky nově syntetizovaného konjugátu nandrolonu na buněčných liniích produkujících AR i těch, které AR přirozeně neprodukují. Fototoxicita byla stanovena WST-1 testem (stanovení metabolické aktivity buněk) po ozáření světlem vlnové délky v rozsahu 450-800 nm (světelná dávka $4 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$), v paralele probíhalo stanovení neozářených buněk. Konjugát ($0,1\text{-}10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nevykazoval bez fotoaktive významnou cytotoxicitu na nádorových liniích LNCaP, AR U-2 OS a PC-3. Nicméně po aktivaci světlem inhiboval konjugát nandrolonu s feoforbidem proliferaci o více než 50 % (od $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) oproti kontrolním neozářeným buňkám. Fluorescenční mikroskopii živých buněk byla určena intracelulární lokalizace konjugátu ($100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 3 h) v endoplazmatickém retikulu (LNCaP, MCF-7) a mitochondriích (LNCaP, PC-3, MCF-7). Díky vysoké fototoxicitě po osvětlení a nízké toxicitě „za tmy“ se zdá být tento konjugát slibným kandidátem pro využití v PDT karcinomu prostaty.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR č. 20/2016.

FLUOROVANÝ ETHYLEN-PROPYLEN MODIFIKOVANÝ ARGONOVÝM PLAZMATEM PRO ADHEZI BUNĚK

LUCIE PETERKOVÁ^a, SILVIE RIMPELOVÁ^a, PETR SLEPIČKA^b, NIKOLA SLEPIČKOVÁ KASÁLKOVÁ^b, MARTIN VESELÝ^c, VÁCLAV ŠVORČÍK^b, TOMÁŠ RUML^a

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, ^bÚstav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha, ^cÚstav organické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 tomas.ruml@vscht.cz

Fluorovaný ethylen-propylen (FEP) je polymer s hladkým hydrofobním povrchem, což výrazně snižuje adsorpci látek a adhezi buněk na jeho povrch. Jedním ze způsobů, jak usnadnit adhezi tkáňových buněk na povrch FEP, je modifikace argonovým plazmatem. Tato jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda zvyšuje smáčivost a drsnost

povrchu polymerního materiálu a vytváří tak podmínky pro adhezi buněk. Připravili jsme matrice FEP modifikované Ar plazmatem o výkonu 3 a 8 W po 0-240 s a kultivovali na nich lidské immortalizované keratinocyty linie HaCaT, které jsou používány jako modelová linie pro testování biokompatibility. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme sledovali jejich adhezi, proliferaci a morfologii v rozsahu 6-72 h. Největší přírůstek měly buňky na maticích modifikovaných 20-80 s, nezávisle na použitém výkonu plazmatu. Buňky HaCaT na modifikovaných maticích byly rozprostřeny jako na kontrolním polystyrenu pro tkáňové kultury (PS), zatímco na nemodifikovaném FEP byly zakulacené a rostly v kulovitých shlucích. S pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla navíc pozorována četná mezibuněčná spojení buněk kultivovaných na vybraných modifikovaných površích. Také metabolická aktivita buněk na modifikovaných maticích, stanovená pomocí WST-1 testu, byla vyšší než na nemodifikované kontrole. Syntéza adhezivních proteinů talinu 1 a vinkulinu, jejichž množství v buňkách ovlivňuje rozptřeni a adhezi buněk^{1,2}, byla stanovena metodou imunoblot a na modifikovaných maticích se výrazně nelišila od PS kontroly. Tyto výsledky naznačují efektivitu povrchové modifikace FEP Ar plazmatem pro zvýšení adheze buněk.

Práce byla financována projektem GACR č. P108/12/G108. Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2016).

LITERATURA

1. Albigès-Rizo C., Frachet P., Block M. R.: J. Cell Sci. 108, 3317 (1995).
2. Rodríguez Fernández J. L., Geiger B., Salomon D., Ben-Ze'ev A.: Cell Motil. Cytoskel. 22, 127 (1992).

NANOSTRUKTUROVANÍ POVRCHŮ JAKO SLIBNÝ NÁSTROJ PRO STUDIUM BUNĚČNÝCH INTERAKCÍ KMENOVÝCH BUNĚK

JAKUB POSPÍŠIL^{a*}, JOSEF VINCENC OBOŇA^e, VRATISLAV KOŠTÁL^e, JARMILA MLČOUŠKOVÁ^b, KATEŘINA KREJČÍ^b, ŠÁRKA BIDMANOVÁ^c, KAMIL PARUCH^d, JIŘÍ DAMBORSKÝ^c, ALEŠ HAMPL^{a,f}, JOSEF JAROŠ^{a,f}

^aÚstav histologie a embryologie, LF; ^bBiologický ústav, LF; ^cÚstav experimentální biologie, PFF; ^dChemický ústav, PFF, Masarykova univerzita, Kamenice 5, Brno; ^eTESCAN Brno, s.r.o., Brno; ^fMezinárodní klinické výzkumné centrum (ICRC), Nemocnice u sv. Anny, Brno pospa.kuba@centrum.cz

Mezibuněčná komunikace a interakce buněk s okolní extracelulární matrix hrají klíčovou roli v mnoha biologických procesech (např. proliferace, diferenciace). Jedná se o komplexní děje, jejichž studium *in vitro* je v současnosti vysoce aktuální, ale doposud založeno na napodobování přirozeného buněčného mikroprostředí spíše v mikrometrovém měřítku. A to buď náhodnou distribucí biomolekul, nebo

organizací molekul v mikrometrových doménách. Ovšem k podrobnějšímu pochopení a detailní analýze mezibuněčných interakcí jsou fyziologicky relevantní rozměry a organizace biomolekul v nanometrové úrovni, proto jsme pro vytvoření nanostruktur využili moderních technologií skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

Cílem této práce byl vývoj litografické techniky pro přípravu nanostrukturovaných povrchů, které by bylo možné dále modifikovat funkčními biomolekulami. K těmto účelům byly platinové nanostruktury deponovány na křemíkový povrch pomocí fokusovaného iontového svazku (FIBID) a svazku elektronů (FEBID).

Topografie a vlastnosti nanostruktur byly charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) a SEM. Metodou FEBID jsme byli schopni optimalizovat depozici vzorů s šířkou čáry méně než 10 nm, čehož v současnosti není možné dosáhnout žádnou konvenčně používanou litografickou technikou. Dále pak byl navržen a realizován nový model pro imobilizaci molekul. Byla vytvořena rekombinantní biomolekula obsahující ephrinový receptor EphA2, která se skrze linker váže ke kovovým povrchům (Au, Pt). Pomocí světelné a imunofluorescenční mikroskopie byla pozorována interakce EphA2 proteinu s embryonálními kmenovými buňkami. Naše výsledky poukazují na možnost využití takovýchto nanostrukturovaných systémů pro detailní analýzu buněčných interakcí.

Tento projekt byl financován Grantovou agenturou MU (MUNI/A/1558/2014, MUNI/A/1352/2015), Evropským regionálním vývojovým fondem - Projekt FNUSA-ICRC (No. CZ.1.05/1.1.00/02.0123) a Grantovou agenturou České republiky - projekt No. GA15-11707S.

URČENÍ BUNĚČNÉ ROLE MS1, MALÉ RNA Z *Mycobacterium smegmatis*

JIŘÍ POSPÍŠIL*, MARTINA JANOUŠKOVÁ,
MICHAELA ŠIKOVÁ, JARMILA HNILICOVÁ,
LIBOR KRÁSNÝ

*Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Videňská 1083, 142 20
Praha 4 – Krč
jiri.pospisil@biomed.cas.cz*

Bakterie se vyznačují svojí vlastností rychle reagovat na změny podmínek okolního prostředí. Tato vlastnost je umožněna změnou genové exprese. Genová exprese je ovlivňována na několika úrovních, z nichž jedna je přepis genetické informace z DNA do RNA (transkripce), za pomoci klíčového enzymu RNA polymerasy (RNAP). Bakteriální RNAP je složena z podjednotek jádra ($\alpha\beta\beta'$) a faktoru sigma, který rozeznává specifickou promotorovou sekvenci na DNA, což vede k zahájení transkripce.

V posledních letech stále roste zájem o regulaci genové exprese pomocí malých nekódujících RNA (sRNA). Jako první sRNA byla v 60. letech objevena 6S RNA u bakterie *Escherichia coli* (délka ~184 nt). Trvalo ovšem dalších ~30 let než byla pochopena její funkce. 6S RNA se váže během stacionární fáze růstu na RNAP, obsahující faktor σ^{70} (primární faktor sigma) a významně ovlivňuje genovou expresi.

V naší laboratoři jsme objevili, že mykobakterie neobsahují 6S RNA, ale jinou sRNA – Ms1 (délka ~300 nt). Ms1 se váže na RNAP bez faktoru sigma a pravděpodobně působí mechanisticky odlišně než 6S RNA1. Po delecii Ms1 z mykobakteriálního genomu a následné sekvenční analýze RNA byl prokázán dramatický vliv Ms1 na genovou expresi. Následně byly určeny fenotypové projevy mutanta bez Ms1 v porovnání s divokým kmenem a navržen model funkce této malé RNA.

Výzkum byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (projekt 15-05228S).

LITERATURA

1. Hnilicová J., Jirátková Matějčková J., Šiková M., Pospíšil J., Halada P., Pánek J., Krásný L.: *Nucleic Acids Res.* 42, 11763 (2014).

PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY U PACIENTŮ S NEMALOBUNĚČNÝM KARCINOMEM PLIC

JANA POTOČKOVÁ^a, RADEK TROJANEC^a, JIŘÍ DRÁBEK^a, JANA STRÁNSKÁ^a, JANA VRBKOVÁ^a, IVONA GRYGÁRKOVÁ^b, VÍTĚZSLAV KOLEK^b, VLADIMÍRA KOUDELÁKOVÁ^a, ZUZANA ŠPORIKOVÁ^a, SOŇA MLČOCHOVÁ^a, MARIÁN HAJDÚCH^a

^aLaboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc;

^bKlinika plicních nemocí a tuberkulózy, Fakultní nemocnice Olomouc, I.P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc
jana.potockova@seznam.cz

Termínem plicní rakovina (též bronchogenní karcinom) můžeme označit nádory vznikající v průduškách a plicní tkáni. Celosvětově patří mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí asociovaných s nádorovým onemocněním jak u mužů, tak i u žen s kreditem více než 1,38 milionů úmrtí ročně. Je proto zcela nezbytné identifikovat biomarkery, které mohou přispět k prognóze a monitorování průběhu onemocnění, stejně jako k predikci léčebné odpovědi. Biomarkery mohou být identifikovány v nádoru samotném, v tělních tekutinách, periferní krvi nebo ve vydechovaném vzduchu. Existuje řada známých biomarkerů pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), který představuje asi 75-80 % nádorů plic. V klinické praxi jsou rutinně vyšetřovány zejména počty kopií chromosomu 7, genů EGFR (epidermal growth factor receptor), ALK (anaplastic lymphoma kinase) a ROS1 (c-ros oncogene 1). Kromě numerických změn je sledována rovněž přítomnost přestaveb v genech ALK a ROS1. Literární zdroje generují celou škálu dalších potenciálních biomarkerů, které by mohly mít prediktivní a prognostický význam. V klinické praxi mohou mít význam pouze ty, které jsou co nejméně technicky, ekonomicky a časově náročné.

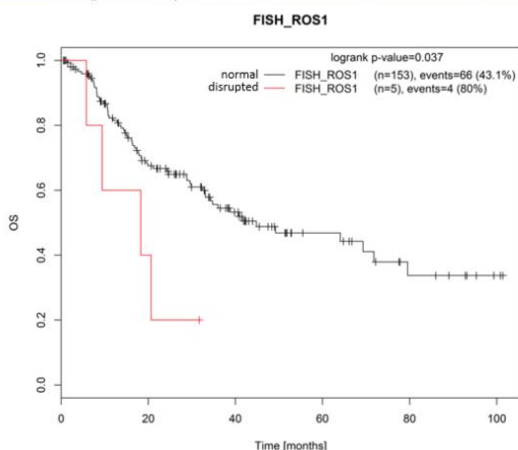
Hlavním cílem naší práce bylo studium vybraných molekulárně-genetických biomarkerů (počet kopií genů EGFR, C-MYC, C-MET, FGFR, přítomnost přestaveb v genech ALK a ROS1, status kopií chromosomů 7 a 8, přítomnost mutací v genech K-RAS a B-RAF) pro objasnění jejich vlivu

na prognózu a predikci léčebné odpovědi u pacientů s NSCLC. Tyto geny hrají důležitou roli v maligních procesech buněk.

V naší studii byl vyšetřován soubor 228 pacientů s NSCLC, léčených v adjuvantním režimu. 70/228 pacientů bylo léčeno pouze chirurgicky, u 158/228 pacientů byla chirurgická léčba následována adjuvantním režimem terapie založeným na kombinaci derivátů platiny s vinorelbinem. Jako materiál byly použity parafinované řezy fixované ve formalinu (FFPE). Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byl vyšetřen status vybraných genů a chromosomů, včetně přítomnosti přestaveb či mutací. Vzorek byl hodnocen jako ALK/ROS1 pozitivní, pokud více než 15 % jader vykazovalo rozdělený signál (typický pro přítomnost přestaveb). Ostatní biomarkery byly považovány za pozitivní, pokud u více než 30 % jader byla detegována ztráta/zisk počtu kopií daného markeru nebo byl průměrný počet kopií vyšší než 2,5. Byla provedena statistická analýza s použitím standardních statistických metod a přístupů (Kaplanova-Meierova analýza, Wilcoxonův „rank-sum“ test, Fisherův test, Mannův-Whitneyův test, atd).

Z hlediska histologie bylo procentuální zastoupení žen v našem souboru pacientů vyšší u adenokarcinomů (48/56 v adeno vs. 17/94 v nonadeno, P -hodnota = 0,001) než u nonadenokarcinomů. Pacienti s adenokarcinomy byli mladší (medián 65 let, $n=104/215$, P -hodnota 0,023 vs. medián 67 let, $n=111/215$).

FISH_ROS1	normal	disrupted	OS			
			N	events	median (95%CI)	HR (95%CI)
	153	5	66 (43.1%)	44.8 (33.1,NA)		
			4 (80%)	18.3 (9.4,NA)	2.8 (1.02-7.84)	0.046
	logrank p-value=0.037					



Obr. 1. Vliv přestaveb ROS1 genu na celkové přežití (OS); Pacienti s ROS1 přestavbami mají horší prognózu a umírají dříve

Bylo zjištěno mnoho očekávaných korelací, které se jeví jako statisticky významné (stage vs. celkové přežití (OS), celkové bezpříznakové přežití (DFS), přežití bez rakoviny (CSS)). Rovněž byly provedeny korelace počtu kopií jednotlivých markerů ve vztahu k histologickému typu nádoru. Z pozorování vyplývá, že procentuální zastoupení amplifikací genu EGFR bylo vyšší u adenokarcinomů, zatímco zvýšený počet kopií genu ALK (podobně jako u C-MYC) byl zastižen

u nonadenokarcinomů. Tento fenomén však nebyl statisticky významný. Dalším parametrem, který jsme v naší studii sledovali, byla korelace přežití pacientů ve vztahu k námi vybraným markerům. Bylo zjištěno, že přítomnost ROS1 přestaveb je špatným prognostickým faktorem, neboť signifikantně zkracuje dobu celkového přežívání pacientů s touto aberací (obr.1).

Rovněž bylo zjištěno, že buňky s jednou aberací tihnou k polyzomii – takovéto změny mají kumulativní charakter a jedna změna bývá často doprovázena ještě jinou (jinými) změnami. Tento fenomén byl pozorován v případě korelací mezi počty chromosomů CEP7 a CEP8, podobně u korelací chromosomů a genů CEP7 a FGFR, CEP8 a ROS1, ROS1 a C-MYC, CEP7 a C-MYC, ROS1 a FGFR. Se zvyšujícím se počtem jednoho markeru došlo v těchto případech ke zvýšení ještě jiného (jiných) markeru(ů).

Z hlediska OS, CSS a DFS se jeví jako statisticky významný i počet kopií chromosomu 8. Monozomie tohoto chromosomu je signifikantně asociovaná s horší prognózou pacientů. Jako speciální kategorie pacientů lze považovat skupinu charakterizovanou přítomností alespoň jedné monozomie a současně alespoň jedné polyzomie sledovaných chromosomů 2,6,7 a 8. Tyto změny jsou asociované rovněž s horší prognózou pacientů.

Vyšetřování počtu kopií chromosomů se jeví jako důležitý prognostický faktor, neboť významně ovlivňuje přežití pacientů. Další statisticky významným faktorem ovlivňujícím OS je přítomnost ROS1 přestavby. Tato aberace je nepříznivým prognostickým faktorem.

Tato práce byla podpořena grantovými projekty IGA UP LF 2015-10, IGA MZ ČR NT/13569, NPU LO1304 a Centrem kompetence pro molekulární diagnostiku a personalizovanou medicínu TE02000058.

GLUTATHION-S-TRANSFERASA U MOTOLICE *Calicophoron daubneyi* A JEJÍ INTERAKCE S OXYKLOZANIDEM

LUKÁŠ PRCHAL^a, RUSSEL MORPHEW^b, PETER BROPHY^b, BARBORA SZOTÁKOVÁ^a

^aFarmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; ^bIBERS, Aberystwyth University, Penlairs, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3FL
prchall@faf.cuni.cz

Motolice patří mezi ploštěnce, kteří parazitují v různých částech těl zvířat i lidí, u zvířat jsou příčinou mnohých onemocnění a tím i ekonomických ztrát chovatelů¹. Motolice bachorová *Calicophoron daubneyi* žije v trávicím traktu ovcí, skotu a dalších přežvýkavců. Na rozdíl od motolice jaterní je nebezpečná pouze při velké infekci a u mladých a oslabených zvířat. Nyní se ovšem rychle šíří po Britských ostrovech². Glutathion-S-transferasa (GST) je enzym metabolizující řadu xen- i eubiotických substrátů. Dalším z důvodů pro výzkum tohoto enzymu je i možnost tvorby vakcín proti parazitózám³. GST byla izolována z homogenátu motolice, přečištěna pomocí glutathionagarosy, stanoveny aktivity a izolovaná GST byla

identifikována pomocí 1D i 2D elektroforézy s následným blotováním a hmotnostně spektrometrickou detekcí. Dále byly také provedeny pokusy *ex vivo* s ovlivněním motolic pomocí léčiva oxyklozanidu (OXC) patřícího do skupiny salicylanilidů a byla sledována jeho účinnost proti motolicím i vliv na GST. Do budoucna by se měly stanovit i aktivity dalších enzymů a zjistit, zda u *C. daubneyi* dochází k metabolismu OXC.

Aktivity GST v homogenátu se pohybovaly kolem 0,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Pomocí imunodetekce bylo zjištěno že část proteinů reaguje s protilátkami anti-sigma-GST i anti-mi-GST. Následně hmotnostně spektrometrické stanovení prokázalo přítomnost sigma GST fragmentů téměř identických s motolicí jaterní. OXC je účinný proti *C. daubneyi* při koncentracích přes 5 μM . Při porovnání aktivity GST u extraktů a čištěných vzorků ovlivněných OXC bylo sice pozorováno mírné zvyšování, ale výsledná změna nebyla signifikantní. Došlo k mírné změně na 2D elektroforetickém gelu.

Práce byla podpořena Univerzitou Karlovou (SVV 260 186).

LITERATURA

- Schweizer G., Braun U., Deplazes P., Torgerson P. R.: *Vet. Rec.* 157, 188 (2005).
- Zintl A., Garcia-Campos A., Trudgett A., Chryssafidis A. L., Talavera-Arce S., Fu Y., Egan S., Lawlor A., Negro C., Brennan G., Hanna R. E., De Waal T., Mulcahy G.: *Vet. Parasitol.* 204, 199 (2014).
- Morrison C. A., Colin T., Sexton J. L., Bowen F., Wicker J., Friedel T., Spithill T. W.: *Vaccine* 14, 1603 (1996).

VARIANTY RETROVIROVÝCH GLYKOPROTEINŮ A JEJICH FUNKCE IN VITRO A IN VIVO

DAVID PŘIKRYL*, VÍT KARAFIÁT, VLADÍMÍR PEČENKA

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

Koevoluce patogenů a jejich hostitelů vedla k selekci celé řady mutací. Z pohledu hostitele se dají nahromaděné mutace v jeho genomu charakterizovat jako restriční faktory bránící efektivní replikaci cílového patogenu, například retroviru. Tyto faktory působí na úrovni vstupu virionu do buňky, jeho integrace, exprese a maturace. Naopak z pohledu viru se mutace projevují ve schopnosti výše zmíněné faktory překonávat. Jedním z mechanismů je například změna receptorové specifity, která umožňuje viru infikovat hostitele i v případě, že původní specifický receptor je z nějakého důvodu nedostupný.

Tato práce se zabývá efektem bodové mutace L154S^{1,2} v obalových glykoproteinech ASLV (ptačí sarkomový a leukosový virus) a jeho podskupin *in vitro* a *in vivo*. Pro tyto účely byly infikovány a analyzovány kuřecí plemena hnědých leghornek a rozličné buněčné kuřecí i savčí kultury pro prozkoumání rozšířeného hostitelského rozsahu viru³.

Výsledky infekce kuřat ukázaly zvýšenou incidenci osteopetrózy, onemocnění projevující se zbytněním kostní tkáně. V souladu s literaturou jsme prokázali, že se jedná o neoplázií polyklonálního původu. Radou experimentů jsme odhalili abnormální chování obalového glykoproteinu kódovaného virem způsobující toto onemocnění. Abnormalita tkví v teplotní labilitě a neutralizaci nízkým pH. Na základě našich pozorování navrhuje model předčasně aktivace glykoproteinu, který tak dovoluje nespecifické splnutí s cílovou membránou nezávisle na receptoru. Tento model se zdá být aplikovatelný i na další druhy a poddruhy virů.

Obalový glykoprotein ASLV je unikátní systém dovolující pozorovat interakci s receptorem a následnou fúzi jako dvě oddělené události dovolující tak detailnější studium funkce tohoto a jemu příbuzných proteinů.

LITERATURA

- Taplitz R. A., Coffin J. M.: *J. Virol.* 71, 10 (1997)
- Rainey G. J. A., Natanson A., Maxfield L. F., Coffin J. M.: *J. Virol.* 77, 12 (2003)
- Rainey G. J. A., Coffin J. M.: *J. Virol.* 80, 2 (2006)

OMEGA-3 POLYNENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY ZMÍRŮJÍ ZÁNĚT TUKOVÉ TKÁŇE

MARTINA ROMBALDOVÁ, ONDŘEJ KUDA, PETRA JANOVSKÁ, JAN KOPECKÝ

*Oddělení biologie tukové tkáně, Fyziologický ústav Akademie věd ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
martina.rombaldova@fgu.cas.cz*

Pro lipidový metabolismus tukové tkáně je důležitá interakce adipocytů a makrofágů. Tkáňově specifická forma makrofágů se účastní zánětu tukové tkáně, který je spojen s obezitou. Tyto makrofágy mohou být polarizovány do stavu M1 (prozánětlivého) nebo do stavu M2 (protizánětlivého). Do tohoto procesu také zasahují lipidové mediátory-eikosanoidy a dokosanoidy, odvozené od omega-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Naším cílem je popsat vzájemné působení adipocytů a makrofágů a charakterizace eikosanoidů v tukové tkáni.

Adipocyty jsme získali z epididymální tukové tkáně myši, které byly 2 měsíce krmeny vysokotukovou dietou, případně dietou obohacenou o PUFA. První část experimentů probíhala jako kokultivace adipocytů a makrofágů z buněčné linie. Ve druhé části pokusů jsme se zaměřili na popis primárních makrofágů získaných přímo z tukové tkáně. Toho bylo dosaženo imunoprecipitací protilátky CD11b navázané na magnetických kuličkách ze stromavaskulární frakce (SVF). K analýzám médií z kultur, makrofágů z buněčné linie, adipocytů i buněk SVF jsme využili kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UltiMate3000 RSLC a QTRAP 5500).

Ze získaných dat vyplývá, že makrofágy M1 a M2 používají mastné kyseliny (FA) rozdílně. M1 je využívají k tvorbě tukových kapek, zatímco M2 podporují jejich β oxidaci. Dále je z našich experimentů patrné, že za produkci protizánětlivého dokosanoidu Protektinu D1 v tukové tkáni zodpovídá SVF. Jejich hlavními producenty v SVF však oproti

očekávání nejsou makrofágy, ale ostatní buňky SVF. Prokázali jsme, že PUFA ovlivňují metabolismus tukové tkáně u myši a ukázali jsme rozdílné využití mastných kyselin makrofágy.

VLIV STRUKTURNÍCH MODIFIKACÍ NA BIOLOGICKOU AKTIVITU KVERCETINU

LENKA ROUBALOVÁ^a, VLADIMÍR KŘEN^b, JITKA ULRICHOVÁ^a, JIŘÍ VRBA^{a*}

^aÚstav lékařské chemie a biochemie; Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci; ^bMikrobiologický ústav, AV ČR, Praha
*vrbamv@seznam.cz

Flavonoid kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon) patří pro své antioxidační a protizánětlivé účinky mezi nejjintenzivněji studované přírodní látky. V naší práci jsme studovali vliv strukturní modifikace s předpokládaným zvýšením biologického účinku (galloylace) a metabolické biotransformace (sulfatace) na schopnost kvercetinu indukovat v myších makrofázích RAW264.7 expresi hemoxygenasy-1. Pro modulaci exprese tohoto cytoprotektivního enzymu, řízenou transkripčním faktorem Nrf2, byl do studie zařazen enzymaticky připravený kvercetin-3'-*O*-sulfát (jeden z hlavních metabolitů kvercetinu) a dva galloylderiváty připravené chemickou syntézou, 3-*O*-galloylkvercetin a 7-*O*-galloylkvercetin.

Metodami kvantitativní PCR a western blotu bylo zjištěno, že kvercetin-3'-*O*-sulfát, na rozdíl od kvercetinu, při koncentracích do 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ neindukuje expresi hemoxygenasy-1. Jak bylo prokázáno metodou HPLC/MS, ztráta biologické aktivity může souviset s nižší absorpcí kvercetin-3'-*O*-sulfátu do buněk¹. V případě galloylderivátů bylo zjištěno, že 3-*O*-galloylkvercetin je neaktivní², zatímco 7-*O*-galloylkvercetin indukoval expresi hemoxygenasy-1, a to účinněji než kvercetin. Nárůst hladin mRNA i proteinu hemoxygenasy-1 vlivem 7-*O*-galloylkvercetinu byl pozorován po 6 h a při koncentracích od 3,75 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Indukce hemoxygenasy-1 vlivem 7-*O*-galloylkvercetinu souvisela s produkcí reaktivních forem kyslíku a aktivací p38 MAPK, neboť byla potlačena *N*-acetylcysteinem (antioxidant) a sloučeninou SB203580 (inhibitor p38 MAPK). Aktivace transkripčního faktoru Nrf2 7-*O*-galloylkvercetinem byla potvrzena měřením luciferasové aktivity ve stabilně transfekovaných buňkách AREc32.

Z uvedených výsledků lze usoudit, že biologická aktivita galloylderivátů závisí na poloze galloyl skupiny, zatímco metabolická sulfatace účinky kvercetinu ruší.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR (č. LO1304) a Univerzity Palackého (č. IGA_LF_2016_012).

LITERATURA

1. Roubalová L., Purchartová K., Papoušková B., Vacek J., Křen V., Ulrichová J., Vrba J.: *Bioorg. Med. Chem.* 23, 5402 (2015).
2. Vrba J., Gažák R., Kuzma M., Papoušková B., Vacek J., Weissenstein M., Křen V., Ulrichová J.: *J. Med. Chem.* 56, 856 (2013).

IZOLACE LIDSKÝCH ENDOTELIÁLNÍCH BUNĚK Z LIPOASPIRÁTU

VERONIKA SEDLÁKOVÁ^{a,b}, LIBOR STREIT^c, JOSEF JAROŠ^a, ZUZANA KOLEDOVÁ^a, ALEŠ HAMPL^{a,b}

^aÚstav histologie a embryologie, LF MU, 625 00 Brno;

^bCentrum biomolekulárního a buněčného inženýrství,

Mezinárodní centrum klinického výzkumu (ICRC), FNUSA,

Pekařská 53, 656 91 Brno, ^cKlinika plastické a estetické

chirurgie, FNUSA, 612 00 Brno

veronika.sedlakova@mail.muni.cz

Tuková tkáň obsahuje celou řadu buněčných typů. Mezi nejhojnější patří adipocyty, fibroblasty a fibrocyty, mesenchymální kmenové buňky a endotelové buňky¹. Díky technice lipoaspirace je získání relativně velkého vzorku lidské tukové tkáně poměrně nenáročné. Lipoaspirát tak představuje hojný zdroj autologních buněk slibujících využití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství. Cílem naší práce bylo vyvinout a ověřit techniku izolace endoteliálních buněk, které by měly kapacitu proliferovat v *in vitro* kultuře a představovaly tak zdroj buněk pro řízenou vaskulogenezi.

Stručně, vzorek lipoaspirátu byl nejprve centrifugován, dále podroben enzymatické digesti, promývání, lýze erytrocytů a filtrování. Získaná suspenze buněk byla nasazena na kultivační misky do endoteliálního růstového media. Při první pasáži byly endotelové buňky ze směsné populace izolovány metodou magnetické separace buněk s použitím povrchové molekuly CD 31.

Získaná buněčná populace byla dále kultivována v *in vitro* podmínkách a následně byla fenotypově a funkčně charakterizována. Světelná mikroskopie odhalila přítomnost dlaždicových buněk. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla na buňkách zjištěna přítomnost molekul CD 31 a CD 90, slabá přítomnost molekul CD 105 a CD 133, dále reaktivita s *Ulex europaeus* aglutininem a reakce s protilátkou proti von Willebrandovu faktoru. Kultivace ve 3D podmínkách ukázala schopnost buněk tvořit trubcovité útvary napodobující vaskulaturu.

Souhrnně jsme prokázali, že lipoaspirát je možným zdrojem buněk s morfologickými a funkčními vlastnostmi typickými pro endotelie. Tyto buňky slibují použití pro tvorbu umělých tkání či modelů s výhodou specifických buněk pro daného pacienta.

Tato práce vznikla za podpory Evropského fondu pro regionální rozvoj - projektu FNUSA-ICRC (č. CZ.1.05/1.1.00/02.0123) a projektu Zdroje pro tkáňové inženýrství 6 (MUNI/A/1352/2015).

LITERATURA

1. Ross M., Pawlina W.: v knize: *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, kap. 6, s. 158. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2011.

FOSFORYLACE ANDROGENOVÉHO RECEPTORU V POZICI SERINU 81 CYKLIN-DEPENDENTNÍMI KINASAMI

ZUZANA SKRÁŠKOVÁ, RADEK JORDA, VLADIMÍR KRYŠTOF

Laboratoř růstových regulátorů, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PŘF Univerzity Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc
zuzana.skraskova@upol.cz

Androgenový receptor (AR) spadá do skupiny jaderných receptorů s funkcí transkripčního faktoru. Po vazbě ligandu, androgenu, je AR translokován do jádra, kde se váže na příslušnou sekvenci DNA a spouští transkripci genů nezbytných pro správný vývoj a funkci mužských pohlavních orgánů. Lokalizace a funkce tohoto jaderného receptoru je regulována prostřednictvím fosforylací některých míst zejména v N-koncové oblasti receptoru. V důsledku vysoké nebo potlačené exprese genů regulujících AR tak může docházet ke vzniku nádorového bujení, a proto je důležité studium kinas podílejících se na fosforylaci receptoru.

Na procesu fosforylace AR v pozici Ser81, která je závislá na vazbě ligandu, se podílí několik cyklin-dependentních kinas (CDK). Popsány byly role CDK1¹ a CDK9², možná je také účast CDK5³. Cílem práce je účinně a specificky umlčet vybrané CDK a sledovat vliv jejich umlčení za současné indukce fosforylace syntetickým androgenem na úroveň fosforylace AR v pozici Ser81 v nádorové buněčné línii C4-2 odvozené od kostních metastáz karcinomu prostaty. Umlčením CDK1/2/4/7 a 9 pomocí RNA interference za použití specifické siRNA a pomocí chemické inhibice selektivními CDK inhibitory bylo zjištěno, že nejen CDK1 a CDK9, ale také CDK2 a CDK7 se podílí na fosforylaci AR-Ser81. Účinek jednotlivých inhibitorů a jejich vliv na replikační potenciál buněk byl navíc ověřen pomocí průtokové cytometrie.

Tato práce vznikla za podpory grantu 15-17282Y grantové agentury České republiky.

LITERATURA

1. Chen S., Xu Y., Yuan X., Buble G. J., Balk S. P.: PNAS 103, 43 (2006).
2. Gordon V., Bhadel S., Wunderlich W., Zhang J., Ficarro S. B., Mollah S. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Xenarios I., Hahn W. C., Conaway M., Carey M. F., Gioeli D.: Mol. Endocrinol. 24, 12 (2010).
3. Hsu F.-N., Chen M.-C., Chiang M.-C., Lin E., Lee Y.-T., Huang P.-H., Lee D.-S., Lin H.: J. Biol. Chem. 286, 38 (2011).

CENTROZOMÁLNÍ ABNORMALITY A MULTIPOLÁRNÍ DĚLENÍ U LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

VERONIKA SLABÁ^a, MILAN EŠNER^a, RADEK FEDR^b, JEAN-YVES TINEVEZ^c, ALEŠ HAMPL^a

^aÚstav histologie a embryologie, LF, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno; ^bBiofyzikální ústav, AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; ^cLa plate-forme d'imagerie dynamique – PFID, Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, 750 15 Paříž, Francie

Lidské embryonální kmenové buňky (hESC) jsou derivovány z vnitřní buněčné masy *in vitro* fertilizované blastocysty. Mezi jejich významné vlastnosti patří vysoká schopnost proliferace a sebeobnovy. Jednou z překážek využití hESC v klinické medicíně je jejich genomická nestabilita, která je spojena s dlouhodobou kultivací *in vitro*. Chromosomální nestabilita je důsledkem nesprávného rozdělení chromosomů v průběhu mitózy a je charakteristickým znakem mnoha nádorových linií. Tento jev je často spojován s abnormálním počtem centrosomů. Již dříve bylo popsáno, že část populace hES buněk obsahuje nadpočetné centrosomy během kultivace *in vitro*¹. Jejich chování a vliv na genetickou nestabilitu v průběhu buněčného dělení však není v současnosti zcela popsáno.

Cílem práce je objasnit, jak nadpočetné centrosomy ovlivňují dělení hES buněk. Pro *in vitro* pozorování buněčného dělení byly vytvořeny transgenní linie nesoucí BAC (bakteriální arteficiální chromosom) obsahující histon H2A, jenž je značený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Nejprve byly transgenní linie charakterizovány a porovnány s parentálními liniemi lidských embryonálních kmenových buněk CCTL14. Na základě časosběrných analýz bylo manuálně vyhodnoceno 20 000 mitóz, z nichž 3 % odpovídala abnormálním mitózám. Z celkového počtu abnormálních mitóz převládaly tripolární mitózy (až 75 %). Méně byly pozorovány tetrapolární mitózy či fúze buněk spojené s následným multipolárním dělením buňky. Dále bylo zjištěno, že většina buněk vzniklých multipolárním dělením je viabilních a není u nich v průběhu našeho pozorování spuštěna buněčná smrt ve fázi anafáze ani v pozdějších fázích mitózy. Na základě časosběrných analýz bylo možné určit délku mezi dvěma bipolárními děleními. Ukázalo se, že medián času mezi dvěma bipolárními děleními je 18 hodin. U buněk, u nichž došlo k tripolárnímu dělení, byly detegovány dvě populace buněk s rozdílnou délkou interfáze, která nebyla způsobena prodlouženou metafází či zastavením dělení ve fázi metafáze s následným nedokončením buněčného dělení, tzv. „mitotic skipping“. Zdá se, že neschopnost zastavit multipolární dělení je jedním z možných mechanismů vzniku aneuploidních hES buněk v průběhu *in vitro* kultivace.

Tento projekt byl financován z projektu HistoPARK – Centrum analýz a modelování tkání a orgánů (CZ.1.07/2.3.00/20.0185) a GA Masarykovy univerzity (MUNI/M/0041/2013).

LITERATURA

1. Holubcova Z., Matula P., Sedlackova M., Vinarsky V., Dolezalova D., Barta T., Dvorak P., Hampl A.: Stem Cells 29, 46 (2011).

PROTEINY CHRÁNÍCÍ KONCE I CENTRÁLNÍ ČÁSTI CHROMOZOMŮ: IDENTIFIKACE ESENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH DOMĚN

MARTIN STOJASPAL, ADELA CALVENTE, CTIRAD HOFER

Molekulární komplexy chromatinu, Středoevropský technologický institut - CEITEC, Kamenice 5, 625 00 Brno 376043@mail.muni.cz

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy na koncích lineárních chromozomů. Lidská telomerová DNA se skládá z tandemových repetitivních sekvencí 5' – TTAGGG – 3'. Ochrana telomer je zajištěna proteinovým komplexem zvaným shelterin, který obsahuje šest proteinů. Shelterin chrání telomery proti poškození, vzájemné rekombinaci nebo fúzi chromozomálních konců¹. Podjednotky shelterinu TRF1 a TIN2 se podílejí na kohezi telomer během buněčného cyklu, skrze jejich interakce s SA1, proteinem kohezinového komplexu. Kohezinový komplex je životně důležitý pro soudržnost chromozomů při mitóze².

Naším cílem bylo zjistit, které domény proteinů TRF1 a SA1 se podílí na jejich vzájemné interakci a jsou tak rozhodující pro jejich funkci. Nejprve jsme připravili všechny domény proteinu TRF1 a N-terminální doménu proteinu SA1, o které je známo, že je zodpovědná za interakci zmíněných proteinů. Poté jsme provedli kvantitativní měření pomocí fluorescenční spektroskopie.

Na základě našich výsledků jsme identifikovali doménu proteinu TRF1, která se s podílí na přímé interakci s kohezinovou podjednotkou SA1 a je nezbytná pro regulaci soudržnosti chromozomů.

Tato práce vznikla za podpory grantů CEITEC (CZ.1.05/1.1.-00/02.0068) a GACR (16-20255S).

LITERATURA

1. de Lange T.: *Science* 326, 948 (2009).
2. Canudas S., Houghtaling B., Kim J., Dynek J., Chang W. Smith S.: *EMBO J.* 26, 4867 (2007).

HEDVÁBÍ MARTINÁČE ČÍNSKÉHO A JEHO VYUŽITÍ PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

LENKA STRNADOVÁ, TOMÁŠ RUML, ZDENĚK KNEJZLÍK

Vysoká škola chemicko technologická, 166 28 Praha 6 Lenka.Strnadova@vscht.cz

Hedvábí je nově objeveným a velmi slibným biomateriálem přírodního původu. Ukázalo se, že díky vysoké biokompatibilitě, biodegradabilitě, teplotní stabilitě, absenci zánětlivé odpovědi imunitního systému a v neposlední řadě dobrým mechanickým vlastnostem mají fibrilární proteiny (fibroiny), tvořící hlavní komponentu hedvábí motýlů, velký potenciál pro využití v tkáňovém inženýrství pro regeneraci kostí, chrupavek či šlach¹⁻³.

Hedvábí bource morušového je známo textilnímu průmyslu již po tisíciletí. Ačkoliv i na poli biomateriálů je toto hedvábí testováno nejhodněji, jako velmi slibné se nyní jeví fibroiny z hedvábných kokonů divokých motýlů, mezi které patří i martináč čínský. Tento druh je velmi zajímavý díky částečné podobnosti jeho fibroinu s hedvábnými vlákny pavoučích, což vláknům propůjčuje výborné mechanické vlastnosti⁴. Mezi další výhody patří také přítomnost RGD (Arg-Gly-Arg) motivů v primární struktuře fibroinu. Tento sekvenční motiv slouží k rozpoznání a vazbě integrinů, zprostředkovávajících adhezi buněk na extracelulární matrix⁵.

Naš výzkum je zaměřen na tvorbu tenkých fibroinových 2D matic, které by byly využity jako tzv. „umělá kůže“. Přípravovány a charakterizovány jsou matrice s různou povrchovou strukturou. Pomocí fluorescenční mikroskopie je testována adheze a morfologie buněk lidských keratinocytů linie HaCaT na námi připravených površích *in vitro*. Skenovací elektronová mikroskopie pak umožňuje blíže pozorovat současně buňky i povrchovou strukturu fibroinové vrstvy. Dle doposud provedených experimentů se matrice jeví jako vhodné pro kultivaci tkáňových kultur.

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

LITERATURA

1. Meinel L., Fajardo R., Hofmann S., Langer R., Chen J., Snyder B., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L.: *Bone* 37, 5 (2005).
2. Wang Y., Blasioli D.J., Kim H.J., Kim H.S., Kaplan D. L.: *Biomaterials* 27, 25 (2006).
3. Altman G.H., Horan R.L., Lu H.H., Moreau J., Martin I., Richmond J.C., Kaplan D.L.: *Biomaterials* 23, 20 (2002).
4. Hayashi C. Y., Shipley N. H., Lewis R. V.: *Int. J. Biol. Macromol.* 24, 271 (1999).
5. Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D.: *Cell Tissue Res.* 339, 1 (2010).

VLIV GENOTOXICKÉHO STRESU NA INTRACELULÁRNÍ LOKALIZACI VISFATINU A NALEZENÍ LOKALIZAČNÍCH SIGNÁLŮ V JEHO SEKVENCI

PETR SVOBODA^a, KAMILA VÁPENKOVÁ^a, EDITA KRÍŽOVÁ^a, ŠÁRKA VORÁČKOVÁ^a, JARMILA ZÍDKOVÁ^a, VÁCLAV ZÍDEK^b, VOJTĚCH ŠKOP^a

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^b Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 svoboda-petr@tiscali.cz

Visfatin je adipokin s insulin mimetickým efektem. V organismu však plní další dvě funkce. Extracelulárně působí jako prozánětlivý cytokin a také se podílí na syntéze NAD⁺ jako enzym. NAD⁺ je využíván v mnohých organelách, proto je možné, vzhledem k úloze visfatinu v syntéze tohoto koenzymu, očekávat transport visfatinu mezi kompartmenty uvnitř buňky. O transportu

a podmínkách, které ovlivňují intracelulární lokalizaci visfatinu je však minimum informací. Naším cílem bylo sledovat *in vitro* intracelulární lokalizaci visfatinu u různých buněčných typů a její změnu po vystavení buněk genotoxickému stresu. Zároveň jsme chtěli nalézt signální oblasti, které jsou za změny v lokalizaci zodpovědné.

Modelové savčí linie byly: hepatocyty HepG2 a 3T3-L1 preadipocyty. Generátory genotoxického stresu byly: peroxid vodíku, UV záření, ethidium bromid, bromdeoxyuridin (BrdU) a RO-3306 (inhibitor cyklin-dependentní kinasy 1). Intracelulární lokalizace visfatinu byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie i) na živých buňkách stabilně transfekovaných vektorem, který nese gen pro visfatin ve fúzi s GFP; ii) imunolokalizací na fixovaných preparátech netransfekovaných buněk a buněk se stabilně vneseným genem pro neznačený visfatin. Lokalizační signální oblasti byly vyhledávány bioinformatickými nástroji a ověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie po transfekci buněk plasmidem s bodovými mutacemi v genu pro visfatin.

Kontrolní 3T3-L1 preadipocyty mají visfatin lokalizován téměř výhradně v cytosolu. Významným pozorováním však bylo, že vystavení buněk 3T3-L1 čimidlům, produkujícím genotoxický stres, mělo u všech námi použitých činidel za následek transport visfatinu do jádra. Buňky HepG2 měly visfatin převážně v jádru, a byly proto dále využity ke hledání jaderných lokalizačních signálů. V sekvenci visfatinu jsme našli dva možné jaderné importní a jeden exportní signál. Po transfekci HepG2 vektory s bodovými mutacemi v nukleárních lokalizačních signálech, jsme visfatin s mutací v jedné ze sekvencí detegovali v cytosolu. Zbylé mutace jaderného signálu neměly na intracelulární lokalizaci visfatinu vliv.

Výsledky u preadipocytů vystavených genotoxickému stresu ukazují, že transport visfatinu do jádra je regulovaný proces, který souvisí s jeho enzymovou aktivitou. Visfatin dodává NAD⁺, který je nezbytný pro jaderné opravné a regulační pochody. Cílenou PCR mutagenézou se v sekvenci visfatinu podařilo nalézt oblast zodpovědnou za transport visfatinu mezi cytosolem a jádrem u nádorových buněk HepG2.

STUDIUM INTRACELULÁRNÍCH DOMÉN ETHYLENOVÉHO RECEPTORU ETR1

AGNIESZKA SZMITKOWSKA*, ZUZANA JASEŇÁKOVÁ, BLANKA PEKÁROVÁ, JAN KOMÁREK, LUKÁŠ ŽÍDEK, MICHAELA WIMMEROVÁ, JAN HEJÁTKO

CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 62500 Brno agnieszka_szmitkowska@wp.pl

Etylén je plynný rostlinný hormon, který se podílí na regulaci vývoje rostlin (např. klíčení semen, zrání ovoce, stárnutí) a na zprostředkování odpovědi k různým biotickým a abiotickým stresům¹. V rostlině *Arabidopsis thaliana* je vnímán rodinou pěti membránově vázaných receptorů, kde dominantní roli hrají receptory ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1) a ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 (ERS1)².

ETR1 a ERS1 jsou jediné dva etylénové receptory s histidinkinasovou (HK) aktivitou (ostatní jsou Ser/Thr

kinasy). Jejich HK aktivita je regulována přítomností dvojmocných kationtů³. Vápníkové (Ca²⁺) a hořčíkové (Mg²⁺) kationty inhibují HK aktivitu ETR1. ERS1 má v přítomnosti těchto kationtů Ser/Thr kinasovou aktivitu. V přítomnosti manganatého kationtu (Mn²⁺) mají oba receptory HK aktivitu. Předpokládáme, že by tento mechanismus mohl hrát roli jako přepínač mezi etylénovou a cytokininovou signální dráhou. Cílem naší práce je objasnit strukturální aspekty a HK aktivitu ETR1 ve vzájemné interakci etylénové a cytokininové signální dráhy.

Naklonovali jsme jednotlivé intracelulární domény ETR1 (histidinkinasová a přijímačová) a připravili proteiny. U histidinkinasové domény jsme testovali kinasovou aktivitu v přítomnosti Mg²⁺ a Mn²⁺ kationtů. Zjistili jsme, že v přítomnosti Mg²⁺ dochází k inhibici autofosforylace. V současné době optimalizujeme metodu pro testování fosfotransferázové aktivity histidinkinasové domény.

Pro studium strukturálních změn vyvolaných dvojmocnými ionty jsme optimalizovali krystalizaci přijímačové domény. Testovali jsme různé teplotní podmínky, různá aditiva a různé techniky krystalizace s cílem získat krystaly s difrakcí menší než 2Å. V současné době se testuje difrakce získaných krystalů.

Nukleární magnetickou spektroskopii jsme použili pro studium interakce přijímačové domény s Mg²⁺. Zjistili jsme, že vazba Mg²⁺ je velmi slabá v porovnání s její vazbou k přijímačové doméně jiné rostlinné histidinkinasy CYTOKININ-INDEPENDENT 1.

Tento výzkum byl finančně podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) a Grantovou agenturou ČR (projekt 13-25280S).

LITERATURA

1. Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E.: *Ethylene in Plant Biology*, 2. vyd. Academic Press, San Diego, CA (1992).
2. Pekarová B., Szmitkowska A., Dopitová R., Degtjarik O., Zidek L., Hejátko J.: *Mol. Plant* 9, 71 (2016).
3. Moussatche P., Klee H. J.: *J. Biol. Chem.* 279, 48734 (2004).

OVLIVNĚNÍ PROPUSTNOSTI A MIKROSTRUKTURY LIPIDOVÝCH MODELŮ KOŽNÍ BARIÉRY NÁHRADOU CERAMIDŮ JEJICH PŘIROZENÝMI BÁZEMI

BARBORA ŠKOLOVÁ, KATEŘINA VÁVROVÁ

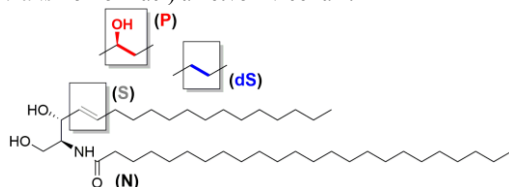
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové skolb5aa@faf.cuni.cz

Ceramidy (Cer) spolu s vyššími mastnými kyselinami a cholesterolem vytváří mezibuněčný prostor nejsvrchnější vrstvy kůže. Podstata bariérové funkce kůže je dána vlastnostmi této lipidové hmoty, tedy jejím složením a uspořádáním. Strukturu Cer představuje obr. 1, molekula je tvořena sfingoidní bázi - sfingosinem (S), fyto sfingosinem (P) nebo

dihydrosfingosinem (dS), jehož primární aminoskupina je acylována mastnou kyselinou (N). Cer mohou být hydrolyzovány, vzniklé sfingoidní báze pak na pokožce působí antimikrobiálně¹. Jak přítomné báze ovlivňují uspořádání a propustnost kožní bariéry však doposud nebylo studováno.

Za tímto účelem byly připraveny lipidové modely kožní bariéry obsahující sfingolipid (Cer/sfingoidní bázi), kyselinu lignocerovou a cholesterol. Tyto lipidové membrány byly hodnoceny permeačními pokusy (impedance, propustnost dvou modelových léčiv) a biofyzikálními metodami (infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce, Langmuirovy monovrstvy na rozhraní voda-vzduch, atomová silová mikroskopie).

Všechny Cer membrány jsou překvapivě propustnější než membrány s jejich příslušnou bází. Z membrán obsahující sfingoidní báze jsou nejpropustnější fytosfingosinové, v nichž lipidové řetězce při teplotě kožního povrchu (32 °C) nejsou uspořádány ve velmi těsné orthorhombické mřížce a v monovrstvě zaujímají větší plochu. V infračervených spektrech fytosfingosinových membrán je patrná úplná ionizace lignocerové kyseliny, v ostatních membránách je kyselina ionizována částečně nebo vůbec. Nejméně propustné jsou dihydrosfingosinové membrány; lipidy jsou v nich uspořádanější (řetězce v orthorhombické mřížce zaujímající all-trans konformaci) a tvoří více fází.



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 260183) a Grantové agentury ČR (13-23891S).

LITERATURA

1. Drake, D. R., Brogden K. A., Dawson D. V., Wertz P. W.: J. Lipid Res. 49, 1 (2008).

PŘÍPRAVA ELASTICKÝCH KOMPOZITNÍCH AMFIFILNÍCH NANOVLÁKEN VHODNÝCH PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE

VERONIKA ŠVACHOVÁ^a, LUCY VOJTOVÁ^{b,c}, JOSEF JANČÁR^{a,b,c}, VIERA KHUNOVÁ^d

^aÚstav chemie materiálů, Fakulta chemická, VUT v Brně, 612 00 Brno; ^bCEITEC – Středoevropský technologický institut VUT, 616 00 Brno; ^cSCITEG, a. s.; ^dÚstav přírodních a syntetických polymerů, STU, 812 37 Bratislava xcsvachova@fch.vutbr.cz

Předložená práce se zabývá přípravou (bio)polymerních kompozitních nanovláken pomocí procesu elektrostatického zvláknování – NanospideruTM. Jedná se o technologii, která umožňuje průmyslovou výrobu nanovláken, využívaných nejen v řadě průmyslových odvětvích, ale stále častěji i v

medicině. V této práci byl výběr jednotlivých složek pro přípravu nanovláken zvolen tak, aby vyhovoval nárokům tkáňového inženýrství.

Úspěšně byla připravena amfifilní nanovláčka ze směsi želatiny a syntetického polykaprolaktonu, která byla následně modifikována pomocí nanotrubek halositu. Anorganický přírodní halosit má tubulární strukturu s vnitřním průměrem 1–50 nm a může sloužit jako potenciální nosič léčiv s kontrolovaným uvolňováním. Důležitým krokem elektrostatického zvláknování je volba rozpouštědla, od kterého se dále můžou odvíjet jednotlivé vlastnosti získaných nanovláken. V našem případě jsme nově zvolili samotnou kyselinu octovou, která je méně toxická než doposud často používaná fluorovaná rozpouštědla.

Chemické složení připravených nanovláken bylo studováno pomocí infračervené spektroskopie a elementární energiové disperzní spektroskopie, které potvrdily přítomnost halositu v nanovláčném materiálu. Pomocí rastrovací elektronové mikroskopie byl určen průměr získaných nanovláken (cca kolem 380 nm) a sledována jejich morfologie. Připravená nanovláčka na bázi želatiny, polykaprolaktonu a halositu vykazovala vyšší hydrolytickou a termickou stabilitu než vlákna bez přídavku nanotrubek. Navíc, nanovláčka modifikovaná halositem o obsahu 0,5 hm. % vykazovala pevnost dvakrát vyšší než nemoifikovaná nanovláčka včetně zvýšeného prodloužení (o 380 %), které dodává novým nanovláčkám výraznou pevnost, lesk a elasticitu. Prvotní studie cytotoxicity ukazují, že materiál je biokompatibilní a vhodný na použití v tkáňovém inženýrství jako materiál pro regeneraci měkké tkáně obsahující nosiče léčiv, respektive signálních molekul využitelných v regenerativní medicíně. Navíc může být připravený materiál vhodnou platformou pro růst buněk a testování léčiv.

Tento výzkum byl finančně podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601).

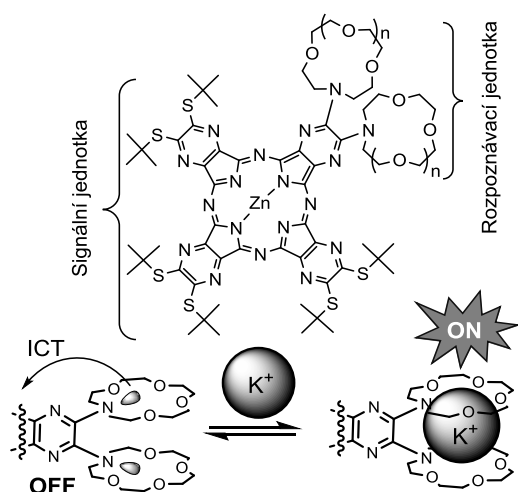
SELEKTIVNÍ FLUORESCENČNÍ RECEPTOR PRO DRASELNÝ KATIONT VE VODNÉM I NEVODNÉM PROSTŘEDÍ

JAN ŠVEC^{a*}, LUKÁŠ LOCHMAN^a, JAROSLAV ROH^a, KAPLAN KIRAKCI^b, KAMIL LANG^b, PETR ZIMČÍK^a, VERONIKA NOVÁKOVÁ^a

^aUniverzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; ^bÚstav anorganické chemie, AVČR, Řež 1001, 250 68 Řež svectjanj@gmail.com

Azaanalogy ftalocyaninů (AzaPc) jsou látky se schopností fluorescence v červené oblasti spektra nad 650 nm (cit.¹).

Fluorescence a její zhášení je základem senzorických vlastností nových, námi syntetizovaných, nesymetrických AzaPc, nesoucích unikátní rozpoznávací jednotku složenou ze dvou azacrownů, designovanou pro rozměrné kationty kovů². Při OFF stavu volný elektronový pár na dusíku azacrownu zháší fluorescenci intramolekulárním přenosem náboje.

Obr. 1. Štruktúra senzoru, kde $n = 1, 2$ alebo 3 a princíp funkcie

Komplexuje-li senzor M^+ , dochádza k zapojení voľného el. páru do koordinácie k M^+ , čo znižuje zhasnenie fluorescence a teda zvyšuje fluorescenciu senzoru (ON stav) v závislosti na koncentrácii M^+ . „Pinzetová štruktúra“ senzoru vykazuje vysokú selektivitu k K^+ a k Ba^{2+} v organických rozpúšťadlách. Ze senzorů byly připraveny křemičité nanočástice pro vodné prostředí, u nichž byla pozorována vysoká odezva pro K^+ (17násobný nárůst fluorescence) a to v současné přítomnosti fyziologických koncentrací Na^+ (135 mM) a Ca^{2+} (2 mM).

Tato práce vznikla za podpory GAČR (14-02165P).

LITERATURA

- Lochman L., Svec J., Roh J., Novakova V.: *Dyes Pigments* 121, 178, (2015).
- Lochman L., Svec J., Roh J., Kiracki K., Lang K., Zimcik P., Novakova V.: *Chem. Eur. J.* 22, 2417 (2016)
DOI: 10.1002/chem.201504268.

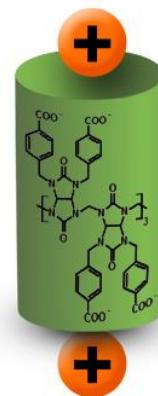
BAMBUSURIL – ALOSTERICKÝ MODULOVATELNÝ DITOPICKÝ RECEPTOR

KRISTÍNA TOMÁŠIKOVÁ^a, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ^{a*}

^aÚstav chemie a Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
177422@mail.muni.cz

Priebeh mnohých biologických a environmentálnych dejov je založený na vzájomnom rozpoznávaní molekúl receptorov a ligandov vo vodnom prostredí. Naša skupina nedávno pripravila vo vode rozpustný cyklický receptor dodeka(4-karboxybenzyl)bambus[6]uril (karboxy-BU6)¹. Ako vyplýva z názvu, jeho štruktúra sa skladá zo 6 glykolurilových jednotiek, ktoré sú substituované 4-karboxybenzylóvymi skupinami vytvárajúcimi 2 hydrofilné portály. Molekuly glykolurilu sú cyklicky prepojené metylénovými mostíkmi a formujú tak hydrofóbnu dutinu.

Vďaka svojej unikátnej stavbe pripomínajúcej bambusové duté steblo sa karboxy-BU6 chová ako ditopický receptor. Vo svojej dutine je karboxy-BU6 schopný komplexovať anióny, ktoré sú stabilizované vodíkovými väzbami medzi metylénovými C-H skupinami a aniónom. Na druhej strane, portály tvorené karboxybenzylóvymi skupinami sa po deprotonácii v bázičkom prostredí stávajú vhodnými elektrostatickými receptormi pre kationy. Pre štúdium interakcií medzi portálmi a kationmi boli zvolené 3 modelové typy bipyridiniových kationov. Na základe pozorovaní získaných metódami NMR, ITC a cyklickej voltametrie boli charakterizované zaujímavé supramolekulárne komplexy v pomere 1:2 karboxy-BU6:kation ovplyvniteľnými vonkajšími stimulmi, napríklad redoxným potenciálom alebo *pH*. Navyše sa pri tvorbe komplexov uplatňuje alosterický efekt, typickejší skôr pre proteíny v živých organizmoch než syntetické receptory.



Obr. 1. Naznačenie komplexu karboxy-BU6 a kationov

Táto práca vznikla za podpory grantov MŠMT ČR (LM2011028 a LO1214) a GAČR (13-15576S).

LITERATÚRA

- Yawer M. A., Havel V., Šindelář V.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 54, 276 (2015).

STANOVENÍ ACIDOBÁZICKÝCH VLASTNOSTÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

**TEREZA TŮMOVÁ^{a,b}, LENKA MONINCOVÁ^a,
VÁCLAV ČEROVSKÝ^a, VÁCLAV KAŠIČKA^a**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^bVysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
tumova@uochb.cas.cz

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou rozsáhle studované biomolekuly s potenciálem nahradit konvenční antibiotika. Tyto peptidy působí proti patogenům dvojitým mechanismem, buď přímo na membráně patogenu, nebo modulací imunitního systému hostitele. Je známo téměř 6000 různých AMP

izolovaných z organismů rostlinné i živočišné říše^{1,2}. Na ÚOCHB AV ČR byla izolována a charakterizována řada AMP z hmyzu, mj. z řádu blanokřídlých. Mezi tyto patří i haliktiny, série AMP izolovaných z včely *Halictus sexcintus* a jejich syntetická analoga.

Haliktiny, krátké alfa-helikální peptidy, vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu a nízkou toxicitu vůči savčím buňkám, jsou tedy vhodnými adepty pro hlubší charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností³. Pro predikci chování těchto molekul v organismu, tedy v kompartmentech o různém pH, je žádoucí stanovení acidobazických vlastností AMP, především stanovení jejich celkového a efektivního náboje, konstanty acidity (pK_a) ionogenních skupin a izoelektrického bodu (pI).

Kapilární elektroforéza (CE) umožňuje stanovení acidobazických vlastností ve variabilních podmínkách iontové síly, pH a při různém složení základního elektrolytu⁴. Pro studium haliktinů pomocí CE bylo využito modifikace stěny kapiláry polymery kvartérních aminů, jež zabraňují adsorpci a ztrátě silně kladně nabitých peptidů během měření. V rozsahu pH 2,00 – 12,50 byly stanoveny elektroforetické pohyblivosti haliktinů a nelineární regresní analýzou jejich závislosti na pH byly spočteny hodnoty pK_a ionogenních skupin a pI peptidů.

Tato práce vznikla za podpory projektů GAČR (15-01948) a AV ČR (RVO 61388963).

LITERATURA

1. Zasloff M.: *Nature* 415, 389 (2002).
2. Yeung A. T. Y., Gellatly S. L., Hancock R. E. W.: *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2161 (2011).
3. Monincová L., Buděšínský M., Slaninová J., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Fučík V., Borovičková L., Bednářová L., Straka J., Čeřovský V.: *Amino Acids* 39, 763 (2010).
4. Kašička V.: *Electrophoresis* 37, 162 (2016).

STRATEGIES FOR DIFFICULT TARGETS: PRODUCTION OF READILY CRYSTALLIZABLE GLYCOPROTEINS IN HEK293S GNTI CELL LINE, A CASE STUDY OF HUMAN LYMPHOCYTE RECEPTORS LLT1 AND NKRPI

ONDŘEJ VANĚK*, JAN BLÁHA

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 40 Prague
ondrej.vanek@natur.cuni.cz*

Recombinant protein expression can be a costly enterprise, especially for proteins that are not easily expressed in prokaryotic cells and are sometimes labeled as „difficult targets“. Here we would like to show a case study of a recombinant expression of such a difficult target – human natural killer cell receptor protein 1 (NKRPI; gene *klrb1*) and its binding partner lectin-like transcript 1 (LLT1; gene *clec2d*). Human embryonic kidney 293 cell line deficient in N-acetylglucosaminyltransferase I (HEK293S GnTI) is well known tool for expression of proteins with homogeneous and deglycosylatable N glycosylation, a feature crucial especially

for protein crystallography¹. However, production protocol using this cell line based on transient transfection of adherent cell culture is costly to scale-up and has reportedly lower expression yields². In this work we have adapted HEK293S GnTI cell line to growth in suspension and optimized its transient transfection. While transfection at standard cultivation cell density proved very little success we have found out that concentrating the cells to high cell density substantially increases transfection efficiency, greatly enhancing protein yields and creating fast and scalable production process. We demonstrate this on the production of soluble LLT1 naturally present on natural killer and T lymphocytes, but upregulated in glioblastoma cells, one of the most lethal tumors, where it acts as a mediator of immune escape³. The prepared soluble domain of LLT1 with homogeneous glycosylation was readily crystallized and following optimization of crystal conditions this protein preparation ultimately led to the first structure determination of this receptor described so far⁴. In order to improve on the productivity for hNKRPI we are now using a stably transfected HEK293S GnTI cell pool with a tenfold yield improvement.

This study was supported by CSF (15-15181S), Charles University (UNCE 204025/2012), BioStruct-X and Instruct European infrastructure projects.

REFERENCES

1. Reeves P. J., Callewaert N., Contreras R., Khorana H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13419 (2002).
2. Aricescu A. R., Lu W., Jones E. Y.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 1243 (2006).
3. Bláha J., Páchl P., Novák P., Vaněk O.: *Protein Express. Purif.* 109, 7 (2015).
4. Skálová T., Bláha J., Harlos K., Dušková J., Koval' T., Stránský J., Hašek J., Vaněk O., Dohnálek J.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71, 578 (2015).

THE ENZYMATIC ACTIVITY OF THE CONSERVED 5'-3' EXORIBONUCLEASE XRN1 IS DOWN- REGULATED VIA ITS SEQUESTRATION AT SPECIALIZED PLASMA MEMBRANE MICRODOMAIN IN YEAST

**KATARÍNA VAŠKOVIČOVÁ^a, THURAYA
AWADOVÁ^a, MIROSLAVA OPEKAROVÁ^a, PETRA
VESELÁ^a, MÁRIA BALÁŽOVÁ^b, JAN MALÍNSKÝ^{a,*}**

*^aMicroscopy Unit, Institute of Experimental Medicine, AS CR, 142 20 Prague; ^bDepartment of Membrane Biochemistry, Institute of Animal Biochemistry and Genetics, SAS, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovakia
malinsky@biomed.cas.cz*

The regulation of gene expression is an essential process for all vital cell functions. One of the key steps in this regulation, the mRNA decay, is in yeast mostly executed by the evolutionary conserved 5'-3' exoribonuclease Xrn1. We

have previously shown that Xrn1 changes its localization depending on the nutritional status of the yeast culture¹. In logarithmic cells with fermentative metabolism, Xrn1 is homogeneously dispersed throughout the cytoplasm. In diauxic cells, where the exhaustion of glucose leads to a switch from fermentative to oxidative metabolism, Xrn1 accumulates in cytoplasmic ribonucleoprotein assemblies, processing bodies (P-bodies), together with other components of the mRNA degradation pathway. In post-diauxic cells, Xrn1 is translocated to the cell cortex where it associates with the plasma membrane microdomains called MCC/eisosomes. This sequestration separates the exoribonuclease from the rest of the mRNA decay machinery¹. In the present study, FRAP analysis shows that Xrn1 dynamically associates with P-bodies, whereas at the cell cortex, it is stably attached to eisosomes. By monitoring the decay of Xrn1-specific substrate, we show that Xrn1 is active when localized in cytoplasm and P-bodies, but its activity is ceased upon its

binding to eisosomes. However, this activity attenuation is reversible as upon glucose addition, Xrn1 rapidly re-localizes back to cytoplasm where its activity is restored immediately. Remarkably, in cells lacking the eisosome organizing protein Pil1, this regulation is abolished. Altogether, we present a novel mechanism of mRNA decay regulation through a sequestration of the Xrn1 enzyme from the rest of mRNA decay machinery to the plasma membrane microdomains.

This work was supported by the Czech Science Foundation (project 15-10641S), and AS CR & SAV joint project SAV-15-02.

REFERENCE

1. Grousl T., Opekarova M., Stradalova V., Hasek J., Malinsky J.: PLoS One 10, e0122770 (2015).



MERCK



Chemické listy SIGMA-ALDRICH



SSB IUMB Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu
Člen IUBMB a FEBS



REJSTRÍK AUTORŮ

Adámik Matej	64	Hermanová Monika	65
Alberti Milan	69	Hlaváč Jan	70
Andrýs Rudolf	53	Hmilicová Jarmila	82
Awadová Thuraya	91	Hofr Ctírad	87
Babrnáková Johana	53	Holec Jan	65
Balážová Mária	91	Hollfelder Florian	57
Balík Aleš	72	Holubová Martina	66
Bazgier Václav	62	Horáková Eva	66
Bednářová Lucie	65	Hošek Jan	67
Bednář David	53	Hyršl Pavel	69
Beerens Koen	53	Chaloupková Radka	53
Bejer Petr	57	Chalupa David	67
Bělohradský Martin	68	Cheetham Michael E.	59
Bendl Jaroslav	53	Chmelář Jindřich	71
Benešová Pavla	54	Chumak Tetyana	74
Berka Karel	62	Jančář Josef	78, 89
Bidmanová Šárka	81	Janiczek Oldřich	71
Bláha Jan	91	Janíková Andrea	77
Blecha Jan	54	Janoušek Jiří	65, 68
Blechová Miroslava	66	Janoušková Martina	82
Blecha Václav	55	Janovská Petra	64, 84
Bohuslavova Romana	74	Jaroš Josef	69, 81, 85
Borková Lucie	55	Jaseňáková Zuzana	88
Borský Marek	80	Ježek Petr	60
Brázdová Marie	64	Jorda Radek	86
Brezovský Jan	53	Jurášek Michal	80
Brichtová Eva	56	Jurík Tomáš	61
Brophy Peter	83	Kádek Alan	68
Brown Jennifer R.	80	Kalbáč Martin	55
Brzobohatý Břetislav	63	Karafiát Vít	83
Buček Jan	56	Kašáková Martina	69
Budinská Alena	57	Kašička Václav	90
Buryška Tomáš	57	Kavan Daniel	68
Buša Michal	58	Kedroňová Eva	76
Calvente Adela	87	Kejnovská Iva	64
Černová Lenka	58	Khunová Viera	89
Černý Jiří	72	Kirakci Kaplan	89
Černý Martin	63	Klán Petr	75
Čeřovský Václav	90	Kloučková Michaela	69
Dalton John	58	Klučáková Martina	73
Damborský Jiří	53, 57, 81	Kmoch Stanislav	59
Deppert Wolfgang	64	Knejzlík Zdeněk	87
Doležal Karel	56	Koblas Tomáš	74
Doležalová Dáša	69	Kocmanová Leona	70
Dostálková Alžběta	58	Koledová Zuzana	70, 85
Drábek Jiří	82	Kolek Vítězslav	82
Drabina Pavel	66, 79	Komárek Jan	88
Drašar Pavel	80	Kopecný Jan	64, 84
Drogowska Karolina	55	Kosinová Lucie	74
Držmišek Jakub	59	Košek Dalibor	72
Dubská Eva	69	Košťál Vratislav	81
Đudáková Lúbia	59	Kotál Jan	71
Dvořák Aleš	60	Kotsyfakis Michail	71
Džubák Petr	55	Koudeláková Vladimíra	82
Enderesová Markéta	60	Kovář David	60
Ešner Milan	86	Krásný Libor	82
Farka Zdeněk	61	Krejčí Kateřina	81
Fedr Radek	57, 86	Krůšek Jan	72
Fischlechner Martin	57	Kryštof Vladimír	86
Fojta Miroslav	65	Křen Vladimír	85
Fojtikova Veronika	61	Křížová Edita	87
Foroutan-Nejad Cina	79	Kučera Dan	54
Fritzscher Bernd	74	Kučera Jiří	71
Gallova Lucia	62	Kuda Ondřej	84
Gandara Zolía	62	Kuneš Jaroslav	66
Gay Sánchez Isabel	62	Kvičala Jaroslav	67
Gilberg Laura	60	Kylarová Salome	72
Gráfová Michaela	63	Lacinová Zdena	66
Grygárková Ivona	82	Ladislav Marek	72
Habánová Hana	63	Lang Kamil	89
Hadravová Romana	58, 68	Lapčík Oldřich	80
Hajdúch Marián	55, 82	Laštůvková Marcela	73
Halada Petr	68	Lenčo Juraj	53
Haluzik Martin	66	Leontovyč Ivan	74
Hápl Aleš	69, 70, 81, 85, 86	Lišková Petra	59
Hansíková Jana	64	Lízal Tomáš	73
Hardcastle Alison J.	59	Lochman Lukáš	89
Havlíček Libor	56	Loukotová Šárka	74
Hejátko Jan	88	Ludwig Roland	68
Helma Robert	64	Macova Iva	74

Madea Dominik	75	Slabá Veronika	86
Macháček Miloslav	75	Slanina Tomáš	75
Maier Lukáš	58, 75	Slepička Petr	81
Maletinská Lenka	66	Slepičková Kasálková Nikola	81
Malinová Lenka	69	Smilek Jiří	73
Malinský Jan	91	Smolková Katarína	60
Man Petr	68	Sojková-Bartošová Pavla	58
Mandl Martin	71	Souček Karel	57
Mankhov Anton	76	Spíchal Lukáš	62
Marek Radek	79	Stará Irena G.	62, 65, 68, 78
Mareš Michael	58	Starý Ivo	62, 65, 68, 78
Márová Ivana	54	Stojaspal Martin	87
Martinkova Marketa	61	Stranava Martin	61
Matějka Pavel	63, 68	Stránská Jana	82
Matějková Stanislava	68	Streit Libor	69, 85
Matoušek Václav	57	Strnadová Lenka	87
Matoušková Zuzana	58	Svoboda Petr	87
Mergl Martin	55	Syka Josef	74
Michlíček Miroslav	76	Szmitkowska Agnieszka	88
Mikulášková Barbora	66	Szotáková Barbora	83
Mlčochová Soňa	82	Šafárik Martin	56
Mlčoušková Jarmila	81	Šámal Michal	62
Mojžeš Peter	76	Šarek Jan	55
Monincová Lenka	90	Šebestík Jaroslav	56
Moravcová Jitka	69	Šebestová Eva	53
Morphew Russel	83	Šíková Michaela	82
Mráz Marek	77, 80	Šimůnek Tomáš	75
Mudroňová Kateřina	76	Šindelář Vladimír	60, 73, 90
Musilová Kateřina	77	Školová Barbora	88
Navrátilová Lucie	64	Škop Vojtěch	87
Nedomová Eva	78	Šporiková Zuzana	82
Nejedlý Jindřich	78	Štefanič Saša	58
Nežil Jiří	54	Švachová Veronika	89
Niederhafner Petr	56	Švec Jan	89
Novák Martin	79	Švenda Jakub	67, 75
Nováková Gabriela	79	Švorčík Václav	81
Nováková Veronika	75, 89	Tinevez Jean-Yves	86
Oboň Josef Vincenc	81	Togni Antonio	57
Obruča Stanislav	54	Tolstogon Genrich V.	64
Obšil Tomáš	72	Tomášiková Kristína	90
Obšilová Veronika	72	Trojanec Radek	82
Opekarová Miroslava	91	Tůmová Tereza	90
Orság Petr	65	Ulrichová Jitka	85
Pakostová Eva	71	Urban Milan	55
Partl Jiří	67	Václavík Jiří	57
Paruch Kamil	58, 81	Valeš Václav	55
Pavlasová Gabriela	80	Vaněk Ondřej	91
Pavličková Vladimíra	80	Vápenková Kamila	87
Pavlinková Gabriela	74	Vaškovičová Katarína	91
Pavlovic Drazen	67	Vávrová Kateřina	88
Pečenka Vladimír	84	Večerek Branislav	59
Pekárová Blanka	88	Veselá Petra	91
Peterková Lucie	81	Veselý Martin	81
Petr Marek	64	Vítek Libor	60
Plíhalová Lucie	56	Vojáčková Petra	67
Pospíšil Jakub	81	Vojtová Lucy	78, 89
Pospíšil Jiří	82	Vondrášek Jiří	58
Pospíšilová Šárka	80	Voráč Zbyněk	69
Potočková Jana	82	Voráčková Šárka	87
Prchal Lukáš	83	Vrba Jiří	85
Prokop Zbyněk	53, 57	Vrbková Jana	82
Prokopec Vadym	68	Vyklický Ladislav	72
Příkryl David	84	Waldmann Herbert	75
Quante Timo	64	Wimmerová Michaela	69, 88
Rimpelová Silvie	80, 81	Wsól Vladimír	53
Roh Jaroslav	89	Zajíčková Lenka	76
Rohlena Jakub	54	Záruba Kamil	80
Rombaldová Martina	84	Zatloukal Marek	56
Roubalová Lenka	85	Zelenka Jaroslav	60
Ruml Tomáš	80, 81, 87	Zemanová Lucie	53
Rumlová Michaela	58	Zidek Václav	87
Rybáček Jiří	65, 68, 78	Zidková Jarmila	87
Rybáčková Markéta	67	Zimčík Petr	75, 89
Řehulka Jiří	55	Zinchenko Anastazia	57
Řimal Václav	76	Železná Blanka	66
Saudek František	74	Židek Lukáš	88
Sedláček Petr	73		
Sedlák Miloš	66, 79		
Sedláková Veronika	69, 85		
Shimizu Toru	61		
Skládal Petr	61		
Skrášková Zuzana	86		



POZNÁMKY

CZECH CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES • ročník/volume 14 (2016), čís./no. 2 • ISSN 2336-7202 (Print), ISSN 2336-7210 (On-line) • ISSN 2336-7229 (CD-ROM) • evidenční 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: B. Kratochvíl • REDAKTÖRI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Podešva, P. Rauch; Webové stránky: P. Zámotný • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • 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 © 2016 Czech Chemical Society Symposium Series/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • 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 25.3.2016.