

## VÄZBA p63 A p73 NA ŠTRUKTÚRNE A SEKVENČNÉ ŠPECIFICKÉ FORMY DNA

**MATEJ ADÁMIK, LUCIE NAVRÁTILOVÁ, MAREK PETR, MIROSLAV FOJTA, MARIE BRÁZDOVÁ**

Byofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno  
matej@ibp.cz

Okrem B-formy pravotočivej dvojzávitnice sa ľudská chromozomálna DNA *in vivo* nachádza aj v ďalších štruktúrnych usporiadaniach (kvadruplex, kruciforma, triplex, topoisomery), ktoré majú pravdepodobne svoje opodstatnenie v regulácii molekulárne biologických procesov.

Pomocou molekulárne biologických metód sme sa zamerali na menej známych homológov transkripčného faktoru p53. Venovali sme sa viacerým konformáciám DNA, pričom snahy o definíciu väzobných (CON) sekvencií naznačujú nezanedbateľný príspevok konformácie DNA<sup>1-3</sup> k uchytieniu diméru/tetraméru sledovaného proteínu na DNA za fyziologických podmienok.

Pre našu prácu boli použité topologicky ako aj sekvenčne odlišné substráty DNA a centrálné domény proteínov rodiny p53 (cit.<sup>4-6</sup>). V imunoprecipitačných, fluorescenčných a na EMSA založených experimentoch bola vizualizovaná rozličná schopnosť skúmaných proteínov interagovať s významne odlišnými substrátmi DNA (kvadruplex, kruciforma, triplex, topoisomery).

Z našich výsledkov vyplýva, že proteíny p63 a p73 podobne ako proteín p53 rozlišujú medzi jednotlivými štruktúrami DNA. Taktiež bol pozorovaný vplyv redoxných a iontových podmienok na vybrané interakcie<sup>6</sup>. Popis nových mechanizmov rodiny p53 pokračuje v snahe porozumieť spôsobu fungovania tohto dôležitého signálneho uzlu bunecných pochodov.

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

### LITERATÚRA

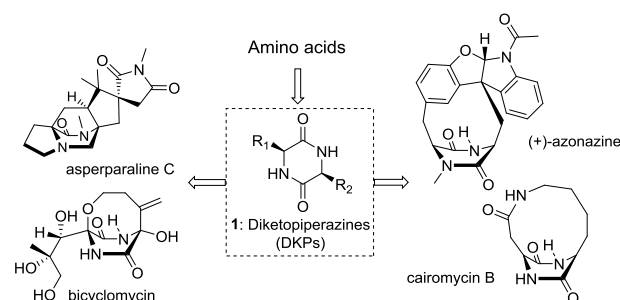
- Chen C., Gorlatova N., Kelman Z., Herzberg O.: *J. Biol. Chem.* 287, 7477 (2012).
- Xue Y, Wang S, Feng X.: *J. Biochem.* 146, 193 (2009).
- Göhler T, Reimann M, Cherny D, Walter K, Warnecke G, Kim E, Deppert W.: *J. Biol. Chem.* 277, 41192 (2002).
- Klein C., Georges G., Kunkele K. P., Huber R., Engh R. A., Hansen S.: *J. Biol. Chem.* 276, 373 (2001).
- Paleček E., Brázdová M., Černocká H., Vlk D., Brázda V., Vojtěšek B.: *Oncogene* 18, 3617 (1999).
- Tichý V., Navrátilová L., Adámik M., Fojta M., Brázdová M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 445 (2013).

## STUDIES TOWARDS BIOLOGICALLY ACTIVE BRIDGED DIKETOPIPERAZINE ALKALOIDS

**TYNCHTYK AMATOV, ULLRICH JAHN**

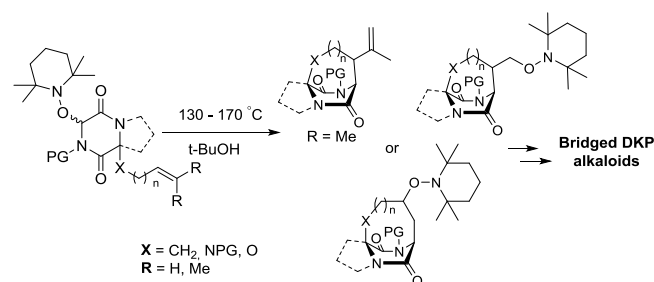
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague  
amatov@uochb.cas.cz, jahn@uochb.cas.cz

Nature's chemical craftsmanship in converting simple amino acids into biologically active complex bridged diketopiperazine (DKP) alkaloids (Scheme 1) with diverse bridge types and sizes inspired us to develop a new methodology towards the synthesis of bridged DKPs.



Scheme 1. Diversity of bridged DKP alkaloids

Taking advantage of the Persistent Radical Effect (PRE)<sup>1</sup> variety of unnatural bridged DKPs were efficiently synthesized which are valuable as constrained peptidomimetics for medicinal chemistry. Our studies towards the synthesis of asperparaline C, bicyclomycin and other alkaloids using the methodology developed in our group will be presented.



Scheme 2. Approach to bridged DKP alkaloids using the PRE

We acknowledge generous funding by the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO:61388963) and the Gilead Sciences and IOCB Research Centre.

### REFERENCE

- For reviews on the PRE, see: a) Fischer H.: *Chem. Rev.*, 101, 3581 (2001); b) Studer A.: *Chem. Eur. J.* 7, 1159, (2001).

## FYTOTOXICITA NANOČASTIC OXIDU ZINOČNATÉHO SLEDOVANÁ NA BUNKOVEJ SUSPENZII TABÁKU BY-2

**LUDMILA BALLOVÁ, PETR BABULA**

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého třída 1/3, 612 42 Brno  
ludmila.ballova@gmail.com*

Nanočastice nachádzajú vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, veľkej ploche a malého objemu, uplatnenie v rôznych odvetviach (chemický, strojársky, elektrotechnický priemysel, medicína aj farmácia). Nanočastice oxidu zinočnatého (ZnO NPs) patria do skupiny najčastejšie používaných nanočastíc z radov oxidov kovov vďaka svojim antikorozióznym vlastnostiam, transparentnosti a schopnosti pohlcovať UVA a UVB žiarenie. Nachádzajú uplatnenie v širokej škále komerčných prípravkov, ktoré nás každodenne obklopujú (transparentné UV ochranné filmy, elektronické zariadenia, sklo, keramika, stavebné materiály, kozmetické prípravky, opaľovacie krémy, atď.). Nárast používania nanočastíc môže mať aj potenciálne negatívne dôsledky v environmentálnej oblasti. Boli potvrdené toxické vplyvy ZnO NPs na klasické toxikologické modely ako napríklad baktérie, bunkové kultúry, riasy aj živočíšne modely<sup>1</sup>. Oblasť fytonanotoxikológie, skúmajúca toxický vplyv nanočastíc na rastliny, je zatiaľ málo preskúmaná. Chýbajú podrobnejšie štúdie zameriavajúce sa na vlastnú fytotoxicitu nanočastíc, rovnako ako na mechanizmy zapojené v toxicite na bunkovej úrovni. Predpokladaný účinok ZnO NPs na rastliny spočíva v troch mechanizmoch – toxicita uvoľneného iónu Zn<sup>2+</sup>, povrchová interakcia s biologickými systémami a produkcia negatívne pôsobiacich látok, napr. reaktívnych foriem kyslíka (ROS)<sup>2</sup>. V našej práci sme si dali za cieľ priniesť nové a unikátne informácie o komplexnom pôsobení ZnO NPs na rastlinný model *Nicotiana tabacum*, L. cv. Bright Yellow – 2 (BY-2). Z tohto dôvodu sme aplikovali ZnO NPs v danej koncentračnej rade - 0, 1, 10, 100 a 400 ml/l, v presne stanovení čas sme odoberali vzorky a skúmali sme účinky na biochemickej a bunkovej úrovni. Naše výsledky sledujúce rast suspenzie tabaku poukazujú, že ZnO NPs pri vyšších koncentráciách vyvolávajú výraznú redukciu až stagnáciu rastu v porovnaní s kontrolnou vzorkou bez nanočastíc. K spomaleniu rastu suspenzie dochádza vplyvom nedostatočného prísunu živín alebo nadbytku niektorých elementov. V našom prípade sa môže jednať o vysokú až toxickú hladinu zinočnatých iónov uvoľnených zo ZnO NPs, ktorých množstvo v bunkách kultúry BY-2 sa priamoúmerne zvyšovalo s narastajúcim množstvom aplikovaných ZnO NPs vo vzorke. Rastlinné bunky sa pred nepriaznivými vplyvmi xenobiotík (napríklad ZnO NPs) chránia zvýšenou produkciou niektorých enzýmov a sekundárnych metabolitov. Takouto zmenou metabolizmu však dochádza k zníženiu syntézy medzi inými aj rastových faktorov a stavebných komponentov, čo následne vedie k spomaleniu rastu. Znížená viabilita a zvýšené množstvo odumretých buniek, spomalenie rastu suspenzie, zvýšená hladina voľných zinočnatých iónov v bunkách, zmena v expresii a aktivite antioxidantov

pôsobiacich enzýmov u vzoriek kultivovaných s najvyššou sledovanou koncentráciou ZnO NPs (400 mg/l) poukazuje, že tieto nanočastice majú schopnosť poškodzovať rastlinné bunky a to pravdepodobne skrz voľné radikály a uvoľňovanie zinočnatých iónov.

*Tato práce vznikla za podpory grantu IGA 88/2013/FaF.*

### LITERATÚRA

1. Ma H., Williams P. L., Diamond S. A.: *Environ. Pollut.* 172, 76 (2013).
2. Dimkpa C. O., McLean J. E., Latta D. E., Manangon E., Britt D. W., Johnson W. P., Boyanov M. I., Anderson A. J.: *J. Nanopart. Res.* 14, 1125 (2012).

## VÝZNAM OCHRATOXINU A VE VÝVOJI BALKÁNSKÉ ENDEMICKÉ NEFROPATIE

**FRANTIŠEK BARTA<sup>a</sup>, KATEŘINA LEVOVÁ<sup>a</sup>, VOLKER M. ARLT<sup>b</sup>, EVA FREI<sup>c</sup>, HEINZ H. SCHMEISER<sup>c</sup>, MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha; <sup>b</sup>King's College London, Velká Británie; <sup>c</sup>Německé centrum pro výzkum rakoviny, 69 120 Heidelberg  
frantisek.barta@centrum.cz*

Rostlinné alkaloidy aristolochové kyseliny (AA) jsou látky vykazující silné karcinogenní a nefrotoxické působení. Vystavení tomuto karcinogenu vede k vývoji specifického onemocnění označovaného jako nefropatie vyvolaná AA (Aristolochic Acid Nephropathy, AAN). Vedle tohoto onemocnění hrají AA též majoritní roli ve vývoji balkánské endemické nefropatie (BEN). Ta vykazuje signifikantní podobnost s AAN. Obě onemocnění jsou doprovázena vývojem nádorů močových cest. Navzdory mnohým studiím je etiologie BEN stále nejasná. Při vzniku této ledvinné fibrosy hraje roli (vedle AA) mnoho faktorů, mezi něž řadíme vliv polycyklických aromatických uhlovodíků, těžkých kovů a též mykotoxinů, zejména ochratoxinu A (OTA).

Vedle AA, jejichž participace na vývoji BEN byla již řadou studií plně prokázána, existují též názory, že látkou zodpovědnou za vývoj BEN je právě OTA. Otázkou tedy je, zda by se na vývoji BEN nemohly podílet obě tyto látky současně, resp. zda OTA nějakým způsobem neovlivňuje genotoxicitu AA (tvorbu aduktů AA s DNA). Z tohoto důvodu byla provedena studie, která simuluje situaci v endemických oblastech BEN, tj. současné působení obou látek zároveň. Pro studii byl jako experimentální model vybrán laboratorní potkan, kterému byla podávána směs AA, OTA a obě látky současně. Byl sledován vliv OTA na osud AA v organismu, a to jak na reakce aktivních vedoucích ke vzniku lézí v DNA, tak též na oxidační O-demethylaci AA za vzniku detoxikačního produktu AAIA.

Analýza aduktů s DNA v orgánech (játra, ledviny a plíce) testovaných zvířat naznačuje, že OTA sice sám adukty s DNA netvoří, nicméně potencuje tvorbu aduktů tvořených

v DNA s AA. Objasnění tohoto fenomenu bylo dalším krokem v naší studii. Redukční aktivace AA je determinována aktivitami enzymů biotransformujícími AA. Proto byl sledován též vliv AA a OTA právě na tyto enzymy (CYP1A, CYP2C, NQO1). Experimenty *in vitro* ukazují, že přítomnost OTA vede k inhibici detoxikace AA. Nárůst aduktů s DNA *in vivo* může tedy být vysvětlen skutečností, že v organismu zůstává vyšší koncentrace AA (vzhledem k inhibované detoxikaci), která je následně redukčně aktivována za vzniku vyšších množství aduktů AA s DNA.

Podporováno GAČR (projekt 303/09/0472), GAUK (projekt č. 570513) a Univerzitou Karlovou (projekt UNCE 204025/2012).

## STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE LIDSKÉ FOSFATIDYLINOSITOL 4-KINASY TYPU II $\alpha$

**ADRIANA BÄUMLOVÁ, EVŽEN BOUŘA**

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i.,  
Flemingovo nám. 21, 166 10 Praha 6  
baumlova@uochb.cas.cz

Fosfatidylinositol 4-kinasa typu II $\alpha$  (PI4K II $\alpha$ ) je jednou ze čtyř lidských kinas katalyzující fosforylaci fosfatidylinositolového kruhu ve 4. pozici. PI4K II $\alpha$  moduluje složení biologických membrán, ovlivňuje buněčnou signalizaci a vnitrobuněčný transport. Díky své enzymové aktivitě a specifickým proteinovým interakcím je PI4K II $\alpha$  asociována s různými lidskými onemocněními. Podílí se na neurologických nemocích v důsledku regulace vnitrobuněčného transportu závislého na klatrinových váčcích. Nepostradatelnou roli hraje kinasa PI4K II $\alpha$  také ve Wnt signalizaci a je nezbytná i pro internalizaci parazita *Listeria monocystogenes*. Poměrně nedávno byla zjištěna její účast v transportu  $\beta$ -glukocerebrosidázy (GBA) do lysosomu. Porucha tohoto transportu způsobená inhibicí enzymové aktivity PI4K II $\alpha$  vede k nemoci označované jako „Gaucher disease“.

Pro její biologickou důležitost a kvůli absenci selektivních inhibitorů jsme se rozhodli pro bližší strukturní charakterizaci PI4K II $\alpha$  metodou proteinové krystalografie. Abychom zvýšili rozpustnost PI4K II $\alpha$  kinázy, sfúzovali jsme ji s T4 lysozymem, což je postup běžně používaný u membránových proteinů. Takto upravený konstrukt byl úspěšně exprimován v *Escherichia coli* a purifikován pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie. Získaný protein o vysoké čistotě byl použit pro krystalizační experimenty. PI4K II $\alpha$  vykryštalizovala v kosočtverečné prostorové grupě symetrie P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 (a=72.5Å, b=75.4Å, c=102.5Å,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ ). Nativní data byla změřena na synchrotronu v rozlišení 2,8 Å. Nyní pracujeme na vyřešení struktury pomocí anomální difrakce.

Tato práce vznikla za podpory grantu MarieCurie FP7-PEOPLE-2012-CIG, číslo projektu 333916, a Akademie věd České republiky (RVO: 61388963).

## VLIV PŘECHODNÝCH KOVŮ NA SEKVENČNĚ SPECIFICKOU VAZBU PROTEINŮ RODINY P53 *in vitro*

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

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

Rodina proteinu p53 kódovaná geny TP53, TP63 a TP73 má významnou roli v mnoha buněčných procesech. Nádorové supresory rodiny p53 vyžadují pro svoji funkci sekvenčně specifickou vazbu k responzivním elementům cílových genů, kterou zajišťuje centrální DNA-vazebná doména (DBD)<sup>1</sup>. Bylo zjištěno, že v důsledku oxidace cysteinů DBD dochází u všech členů rodiny p53 k inhibici sekvenčně specifické vazby, která je spojena se ztrátou zinečnatých iontů<sup>2</sup>. Dalšími studiemi bylo ukázáno, že nadbytek iontů Zn<sup>2+</sup> podobně jako iontů těžkých kovů naopak inhibuje sekvenčně specifickou vazbu proteinu p53<sup>3,4</sup>. Je známo, že homeostáza zinku je výsledkem koordinované regulace a intracelulární koncentrace Zn<sup>2+</sup> je v korelaci s osudem buňky. Zatímco absence zinečnatých iontů brání syntéze funkčních proteinů, jeho nadbytek je cytotoxický<sup>5</sup>.

V naší práci jsme se zaměřili na studium vlivu dvoumocných kationtů zinku, kadmia, kobaltu a niklu na sekvenčně specifickou vazbu proteinů p53, p63 a p73. Pozorovali jsme inhibici této vazby u centrálních domén proteinů zmíněnými ionty kovů již při mikromolárních koncentracích. Naše experimenty s DNA fragmenty a oligonukleotidy, které obsahovaly sekvence promotorových oblastí cílových genů rodiny p53 (např. p21, MDM2), potvrzují inhibiční efekt Zn<sup>2+</sup>. Je zajímavé, že zinečnaté ionty výrazně méně inhibovaly proteiny p63 a p73 ve srovnání s proteinem p53. Zatímco v případě těžkých kovů jsme pozorovali inhibici při velice podobných koncentracích.

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

## LITERATURA

1. Klein C., Georges G., Kunkele K. P., Huber R., Eng R. A., Hansen S.: J. Biol. Chem. 276, 37390 (2001).
2. Tichý V., Navrátilová L., Adámik M., Fojta M., Brázdová M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 433, 445 (2013).
3. Paleček E., Brázdová M., Černocká H., Vlk D., Brázda V., Vojtěšek B.: Oncogene 18, 3617 (1999).
4. Coffey A. I., Knowles P. P.: Biochim. Biophys. Acta 1209, 279 (1994).
5. Chimienti F., Aouffen M., Favier A., Seve M.: Curr. Drug Targets 4, 323 (2003).

## ROLE DESATURAS MASTNÝCH KYSELIN V EVOLUCI SEXUÁLNÍCH FEROMONŮ MŮR

**ALEŠ BUČEK<sup>a</sup>, PETRA MATOUŠKOVÁ<sup>a</sup>, HEIKO VOGEL<sup>b</sup>, PETR ŠEBESTA<sup>a</sup>, ULLRICH JAHN<sup>a</sup>, JERRIT WEIBFLOG<sup>b</sup>, ALEŠ SVATOŠ<sup>a,b</sup>, IVA PICHOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Str. 8, D-07745, Jena, Německo  
Bucek@uochb.cas.cz

Sexuální feromony hmyzu jsou směsí druhově vysoce specifických převážně těkavých látek, které slouží k nalezení partnera téhož druhu. I přes stabilizující přirozený výběr, který působí proti změnám ve složení feromonové směsi, však u hmyzu pozorujeme značnou různorodost feromonových struktur. Tento rozpor vysvětluje hypotéza, podle které pouze skokové změny ve feromonovém složení, jako je například začlenění nové látky do feromonové směsi, mohou v populaci hmyzu přetrvat a vést až ke vzniku nových druhů.

U početné skupiny lišajovitých mŮr, jejíž zástupci slouží jako modelové organismy pro biochemické a molekulárně-biologické studie hmyzu, jsou typickými feromonovými prekurzory jedno- a dvounenasycené mastné kyseliny (1MK a 2MK). Klíčovou roli v biosyntéze feromonů zde hrají membránové desaturasy mastných kyselin, které zavádí dvojné vazby do řetězců MK. Lišaj tabákový (*Manduca sexta*) však produkuje komplexní feromonovou směs, která navíc obsahuje deriváty třinástenasycených mastných kyselin (3MK). Tato práce se věnuje identifikaci desaturas, které produkují 3MK, a objasnění jejich role v evoluci feromonů mŮr.

V transkriptomu feromonové žlázy lišaje tabákového jsme našli tři abundančně transkribované geny desaturas. Kromě genu *MsexD2*, jehož roli v biosyntéze 1MK a 2MK jsme popsali v předchozí studii<sup>1</sup>, byly nalezeny geny *MsexD3* a *MsexD5*. *MsexD3* a *MsexD5* byly exprimovány v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a analýzou produkovaných MK bylo zjištěno, že desaturují výhradně 2MK na 3MK. Vysoká sekvenční podobnost genů *MsexD2* a *MsexD3* (91 %) naznačuje, že oba geny vznikly duplikací ancestrálního genu. Mutagenezí nekonzervovaných aminokyselinových zbytků u *MsexD2* a *MsexD3* a následnou charakterizací produktů mutovaných desaturas jsme zjistili, že rozdílnou substrátovou specifitu *MsexD2* a *MsexD3* určuje jediný aminokyselinový zbytek transmembránové domény na pozici 224. Substituce Ala224→Ile224 vedla u *MsexD2* k zisku desaturasové specifity *MsexD3* a k produkci 3MK.

Výsledky studie ukazují, že schopnost produkovat 3MK se u *MsexD3* mohla vyvinout genovou duplikací ancestrálního desaturasy a následnou substitucí jediného aminokyselinového zbytku. Tímto mechanismem mohla vzniknout komplexní feromonová směs lišaje tabákového.

### LITERATURA

1. Matoušková P., Svatoš A., Pichová I.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 601 (2007).

## ŠTÚDIUM INTERAKCIÍ DNAA PROTEÍNU V BUNKÁCH *Acetobacter pasteurianus* 3610

**JURAJ BUGALA, VIERA CIMOVÁ, MARTIN BABIČ, JOZEF GRONES**

Univerzita Komenského, PrF, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4  
juraj.bugala@gmail.com

DnaA proteín patrí do rodiny AAA+ proteínov. Je kódovaný *dnaA* génom na chromozóme baktérii. Je to hlavný iniciačný proteín baktérii, jeho homológ bol identifikovaný aj v eukaryotoch. V procese iniciácie replikácie sa viaže na DNA v počiatku replikácie (*ori*) v miestach so špecifickou sekvenciou, tzv. DnaA boxy<sup>1</sup>. Takisto interaguje s inými replikačnými proteínmi napr. DnaB, Hu, IHF $\alpha$ <sup>2</sup>.

Tento proteín je zložený zo štyroch domén, z ktorých má každá vlastnú špecifickú funkciu. N-terminálna doména zabezpečuje proteín-proteínové interakcie, oligomerizáciu DnaA proteínu a jeho interakciu s DnaB proteínom. Druhá doména je veľmi variabilná a slúži ako spojovník medzi prvou a treťou doménou<sup>3</sup>. Na tretej doméne je lokalizované ATP väzobné miesto, Walker A a Walker B motívy a *sensor I* a *sensor II* motívy. Táto doména je zodpovedná ako za väzbu ATP tak aj za jeho hydrolyzu<sup>1</sup>. Na C-terminálnej doméne sa nachádza helix-otáčka-helix DNA väzobná sekvencia. Mutácie v tejto oblasti viedli k strate schopnosti proteínu viazať sa na DNA<sup>4</sup>.

V našej práci sme sa zamerali na štúdium DnaA proteínu v bunkách octových baktérii. Na základe nukleotidovej sekvencie génu *Acetobacter pasteurianus* IFO 3281-01 sme navrhli priméry na amplifikáciu *dnaA* génu. Bioinformatickými metódami sme porovnali *dnaA* gén z *E. coli* a z *Acetobacter pasteurianus* 3610 na úrovni nukleotidov aj aminokyselín. Amplifikovaný gén sme klonovali do vektoru pET30a+, čo zaistilo fúziu DnaA proteínu s His-taq značkou. Fúzy proteín sme purifikovali na kolónke His-Select Nicel Affinity Gel (Sigma). „Electro Mobility Shift Assay“ metódou sme overili schopnosť purifikovaného proteínu viazať sa na predpokladaný počiatok replikácie ORI. Schopnosť DnaA proteínu interagovať s ontológmi z iných baktérii sme overili využitím dvojhybridného systému BACTH.

V nasledujúcej práci sa chceme zamerať na presné stanovenie predpokladaných aktivít (helikázová a ATPázová aktivita) DnaA proteínu. A tieto výsledky porovnať s DnaA proteínom z *E. coli*.

Táto práca bola podporená z grantu UK/353/2013.

### LITERATURA

1. Duderstadt K., Mott M., Crisona N., Chuang K., Yang H., Berger J.: *J. Biol. Chem.* 285, 28229 (2010).
2. Messer W., Weigel Ch.: *Mol. Microbiol.* 24, 1 (1997).
3. Messer W., Blaesing F., Majka J., Nardmann J., Schaper S., Schmidt A., Seitz H., Speck Ch., Tungler D., Wegrzyn G., Weigel Ch., Welzcek M., Zakrzewska-Czerwinska J.: *Biochimie* 81, 819 (1999).
4. Fujikawa N., Kurumizaka H., Nureki O., Terada T., Shirouzu M., Katayama T., Yokoyama S.: *Nucleic Acids Res.* 31, 2077 (2003).

## SYNTÉZA EXTENDOVANÝCH HELICENŮ

MICHAL BUCHTA<sup>a</sup>, PETR HOLÝ<sup>a</sup>, GRAHAM J. BODWELL<sup>b</sup>, IRENA G. STARÁ<sup>\*a</sup>, IVO STARÝ<sup>\*a</sup><sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL A1C 5S7, Kanada buchta@uochb.cas.cz

Heliceny jsou polycyklické aromatické látky, jejichž helikální skelet je tvořen *ortho*-anelovanými benzenovými jádry. Připojením dalších aromatických jader lze helikální skelet rozšířit a připravit tak extendované heliceny. Předpokládá se, že by tyto rozsáhlé  $\pi$ -konjugované systémy mohly vykazovat zajímavé chiroptické vlastnosti jako např. extrémně vysoké hodnoty optické rotace, extrémní CD spektra nebo cirkulárně polarizovanou fotoluminiscenci. Další využití neracemických extendovaných helicenu by mohlo být v asymetrické katalýze<sup>1</sup>.

Toto sdělení se zabývá syntézou extendovaných helicenu 2, 3 a 4 z komerčního pyrenu 1 jako základního stavebního bloku (schéma 1). V několika krocích byly připraveny trieny jako vhodné intermediáty pro niklem katalyzovanou [2 + 2 + 2] cyklotrimerizaci, která probíhá ve vysokém výtěžku. Bylo ověřeno, že metodika využívající cykloisomerizaci aromatických trienů katalyzovanou tranzitními kovy resp. diastereoselektivní cykloisomerizaci centrálně chirálních trienů<sup>2</sup>, která byla vyvinuta v naší laboratoři pro efektivní syntézu penta- až undekahelicenu<sup>3</sup>, může být využita i pro přípravu racemických (*rac*-2) či opticky čistých ((*M,R,R*)-3 a (*M,R,R*)-4) extendovaných helicenu.

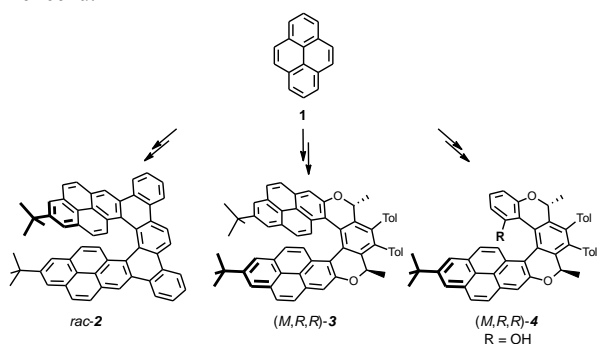


Schéma 1

Podporováno grantem GA ČR (reg. č. P207/10/2207) a ÚOCHB AV ČR (RVO: 61388963).

## LITERATURA

1. Takenaka N., Sarangthem R. S., Captain B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 9708 (2008).
2. Žádný J., Jančařík A., Andronova A., Šámal M., Vacek Chocholoušová J., Vacek J., Pohl R., Šaman D., Cisařová I., Stará I. G., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 5857 (2012).
3. Stará I. G., Starý I. v knize: *Science of Synthesis* (J. S. Siegel, Y. Tobe, ed.), Vol. 45b, s. 885. Thieme, Stuttgart 2010.

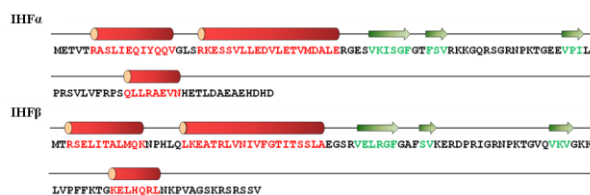
INTERAKCIA IHF PROTEÍNU S POČIATKOM REPLIKÁCIE V BUNKÁCH *Acetobacter pasteurianus*

VIERA CIMOVÁ, JURAJ BUGALA, MARTIN BABIČ, JOZEF GRONES

Univerzita Komenského v Bratislave, PrF, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4 vieracimova@gmail.com

IHF proteín bol prvý krát popísaný v bunkách baktérie *E. coli* ako esenciálny proteín pri miestne špecifickej integrácii a excízii bakteriofága  $\lambda$ . Nasledujúce *in vitro* ako aj *in vivo* štúdie preukázali, že okrem DNA rekombinácie tento proteín participuje v mnohých ďalších molekulárno-biologických procesoch, ako je DNA replikácia, DNA transfer, DNA partitioning či regulácia génovej expície. IHF proteín sa viaže na DNA, kde napomáha formovaniu vyššie organizovaných nukleoproteínových štruktúr<sup>1</sup>.

Predchádzajúce štúdie IHF proteínu v bunkách *E. coli* odhalili jeho štruktúru, vlastnosti, ale aj úlohu v procese DNA replikácie. IHF proteín však doposiaľ nebol preskúmaný v bunkách octových baktérií. Primárna aminokyselínová sekvencia jednotlivých podjednotiek proteínu sa v porovnaní s IHF proteínom *E. coli* výrazne líši, čo môže mať vplyv na spôsob, akým proteín interaguje v bunkách octových baktérií.

Obr. 1. Sekundárna štruktúra podjednotiek IHF $\alpha$  a IHF $\beta$ 

Z chromozómu octovej baktérie *Acetobacter pasteurianus* LMG 1513 sme amplifikovali gény *ihfA* a *ihfB* pre jednotlivé podjednotky IHF proteínu. PCR produkty sme klonovali do expresného vektora pET30a<sup>+</sup>. Pripravené konštrukty sme využili na indukčnú expresiu príslušných génov vo fúzii s hexahistidinovou sekvenciou (His-Tag) v T7 expresnom systéme buniek *E. coli* BL21 (DE3). Nadprodukované His-Tag fúzané podjednotky IHF $\alpha$  a IHF $\beta$  sme purifikovali afinitnou chromatografiou na niklovej matici. Schopnosť jednotlivých podjednotiek IHF proteínu interagovať s počiatkom replikácie baktérie *A. pasteurianus* LMG 1513 sme overili metódou EMSA.

## LITERATÚRA

1. Senear D. F., Tretyachenko-Ladokhina V., Opel M. L., Aeling K. A., Hatfield G. W., Franklin L. M., Darlington R. C., Alexander Ross J. B.: *Nucleic Acids Res.* 35, 1761 (2007).

## 1,2-DIHYDROPIRAZINY S FOTOLUMINISCENČNÍMI VLASTNOSTMI

**RADEK COUFAL, DUŠAN DRAHOŇOVSKÝ, JAN SVOBODA, IVANA ČÍSAŘOVÁ, ZDENĚK TOŠNER**

*Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
coufalr@natur.cuni.cz*

Ačkoli fyzikálně-chemické vlastnosti 1,4-dihydropyrazinů jsou známé<sup>1</sup>, co se týká vlastností 1,2-dihydropyrazinů, existuje pouze omezené množství prací<sup>2</sup>. V této práci byly redukcí komplexními hydridy (NaBH<sub>4</sub>, LiBH<sub>4</sub>) připraveny 1,2-dihydropyrazindiesteri **1** a **2** (Schéma 1), které vykazují zajímavé fluorescenční vlastnosti v roztoku i v pevné fázi.

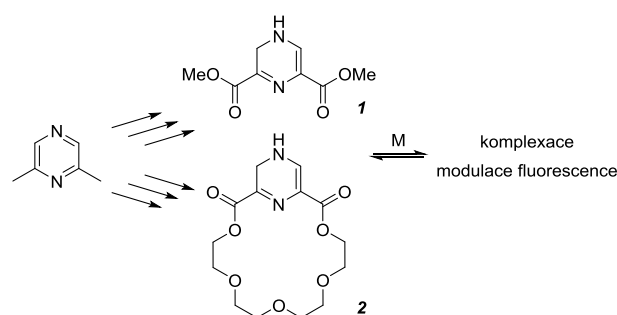


Schéma 1. Připravené 1,2-dihydropyrazindiesteri **1** a **2**

Jejich fluorescence je výrazně závislá na typu rozpouštědla, lze ji ovlivňovat pomocí komplexace s ionty kovů, se kterými vykazují vysoké hodnoty konstant stability komplexace, a také se výrazně liší v roztoku a v pevné fázi. V neposlední řadě tyto látky i jejich komplexy vykazují značný Stokesův posuv. Připravené látky byly detailně charakterizované, včetně rentgenostrukturní analýzy a jejich vlastností byly studovány také na teoretické úrovni.

Vzhledem ke zmíněným a dalším zajímavým vlastnostem těchto látek je možné predikovat jejich potenciální využití např. na poli nových organických materiálů s fotoluminiscenčními vlastnostmi v pevné fázi, biologických senzorů, či bioorganické chemie.

*Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MS0021620857.*

### LITERATURA

1. Kaim W.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22, 171 (1983).
2. Williams J. R., Cossey J. J., Adler M.: *J. Org. Chem.* 37, 2963 (1972).

## IDENTIFIKACE MicroRNA ZAPOJENÝCH DO REAKCE NA POŠKOZENÍ DNA V MALIGNÍCH B LYMFOCYTECH A JEJICH BIOLOGICKÁ A KLINICKÁ RELEVANCE

**KATEŘINA ČERNÁ<sup>a</sup>, JAN OPPELT<sup>a</sup>, RAFFAELE CALOGERO<sup>b</sup>, ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ<sup>a</sup>, MAREK MRÁZ<sup>\*a</sup>**

*<sup>a</sup>CEITEC Masarykova univerzita, Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno; <sup>b</sup>Dept. of Biotechnology and Health Sciences, University of Torino, Via Nizza 52, 10126 Torino  
katerina.cerna384@gmail.com, marek.mraz@email.cz*

MicroRNA (miRNA) jsou důležitými posttranskripčními regulátory genové exprese. Deregulace miRNA u nádorových onemocnění byla poprvé pozorována u chronické lymfocytární leukemie (CLL). Naše práce se zaměřuje na identifikaci miRNA zapojených do apoptotické odpovědi CLL buněk po působení fludarabinu (F), který je základem léčby u CLL. V minulosti jsme již prokázali, že deregulace miRNA souvisí s prognózou CLL.

CLL buňky z periferní krve pacientů byly *in vitro* vystaveny působení F (3,5 μg.ml<sup>-1</sup>/48 h). Rozdílná exprese miRNA (kontrola vs. 3,5 μg.ml<sup>-1</sup>; N=20) byla analyzována pomocí qRT-PCR a sekvenováním nové generace (SOLiD, Illumina). Bylo identifikováno 6 miRNA zapojených do odpovědi na F. Nejlépe charakterizovanou a stabilně indukovanou byla miR-34a. Na rozsáhlé kohortě (N=158) jsme testovali využití miR-34a jako prognostického markeru nezávislého na rutinně používaných markerech (FISH, IgVH, věk, pohlaví). Stanovením množství molekul miR-34a ve vzorku jsme identifikovali pacienty s extrémně nepříznivou prognózou a to u pacientů s nejnižší expresí miR-34a (celkové přežití 16 měsíců vs. nedosaženo; *p*=0,0001; HR=3,89; CI=2,05-7,39). V předchozích pracích jsme popsali korelaci hladiny miR-34a s mutačním stavem p53. miR-34a však zůstala i v kohortě s wt-p53 (N=116) nejsilnějším prediktorem (15 měsíců vs. nedosaženo; *p*=0,002; HR=9,82; 95% CI=2,30-42,05). Stejný trend jsme pozorovali i u pacientů podstupujících terapii zahrnující F (N=51), kde nízká bazální hladina a nízká indukce po podání terapie indikovala kratší čas do selhání terapie (12 vs. 26 měsíců; *p*<0,05) a čas do relapsu (15 měsíců vs. nedosaženo; *p*<0,05). Díky korelaci miR-34a a p53 abnormalit je na základě hladiny miR-34a možná identifikace pacientů s mutací v p53, kterou nelze odhalit pomocí FISH. Nadále probíhá identifikace drah regulovaných miR-34a a dalšími miRNA zapojenými do odpovědi na poškození DNA v B buňkách.

*Podpořeno NGS-PTL (FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1, č. 306242); EHA Research Fellowship award; GAČR (14-22712P); IGA MZ ČR NT11218-6/201; CZ.1.07/2.4.00/17.0042; MUNI/A/0723/2012; SoMoPro II Programme, CZ.1.07/2.3.00/30.009, spolufinancováno z EU a ČR.*

**VČELÍ JED AKO ZDROJ ANTIMIKROBIÁLNÝCH PEPTIDOV: ŠTÚDIUM MECHANIZMU ÚČINKU****SABÍNA ČUJOVÁ, VÁCLAV ČEŘOVSKÝ***Ústav organickej chemie a biochemie, AVČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
cujova@gmail.com*

Evolúcia a prirodzený výber obdarila všetky organizmy rôznorodými obrannými systémami potrebnými pre prežitie. Jedným z obranných systémov, ktorý je súčasťou vrodenej imunity a tvorí prvú obrannú líniu, sú antimikrobiálne peptidy (AMP)<sup>1</sup>. Prvé AMP boli izolované v 80. rokoch z hmyzu<sup>2</sup>. Tieto malé a rôznorodé peptidy hrajú dôležitú rolu pri prežití v bakteriálne bohatých prostrediach. Dnes AMP patria medzi sľubnú skupinu látok, ktoré by mohli byť využité proti baktériám rezistentným na dostupné antibiotiká<sup>1</sup>.

COD-1 je kladne nabitý amfipatický AMP, tvoriaci  $\alpha$ -helix, ktorý bol izolovaný z jedu divokej včely *Colletes daviesanus*. Táto práca študuje rôznymi biofyzikálnymi metódami mechanizmus účinku COD-1 a jeho syntetických analógov (CODs). Pri sledovaní interakcií CODs s umelými fosfolipidovými membránami-lipozómami, bolo metódou úniku calceinu zistené, že k narušeniu membrán peptidmi dochádza len v prípade lipozómov imitujúcich bakteriálnu membránu. Lipozómy imitujúce membránu erytrocytov narušené neboli. Výsledok korešponduje s ich dobrou antimikrobiálnou aktivitou proti Gram pozitívnym a Gram negatívnym baktériám a nízkou hemolytickou aktivitou. Sledovanie zmeny fluorescence tryptofánu, ktorý je súčasťou dvoch analógov COD-1, umožnilo presnejšie zistenie ako peptidy interagujú s lipozómami imitujúcimi bakteriálnu membránu a membránu erytrocytov. Interakcie CODs-fosfolipidová membrána boli tiež študované na *E. coli*. Zistilo sa, že CODs narušujú vonkajšiu i vnútornú membránu *E. coli*. Tieto skutočnosti boli zistené meraním zmeny fluorescence 1-*N*-fenylnaftylamin a sledovaní  $\beta$ -galaktozidázovej aktivity po pridaní peptidu. Výsledky z transmisnej elektrónovej mikroskopie ukázali že COD-1 narušuje membránu v mieste delenia *E. coli* a spôsobuje uvoľnenie bakteriálneho obsahu von z baktérie.

*Tato práca vznikla za podpory grantu GAUK 645012.*

## LITERATÚRA

1. Rotem S., Mor A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1582 (2009).
2. Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. G.: *Eur. J. Biochem.* 106, 7 (1980).

**VLIV VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA GLOBÁLNÍ EXPRESI mikroRNA V HEPATOCYTECH****ZDENĚK DOSTÁL<sup>a</sup>, MARTIN SEBERA<sup>b</sup>, JOSEF SROVNAL<sup>c</sup>, MICHAELA SEDLÁČKOVÁ<sup>c</sup>, KATEŘINA ŠTAFFOVÁ<sup>c</sup>, LENKA RADOVÁ<sup>d</sup>, MARTIN MODRIANSKÝ<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP, 775 15 Olomouc; <sup>b</sup>Fakulta sportovních studií MU Brno; <sup>c</sup>Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc; <sup>d</sup>Středoevropský technologický institut, MU Brno.  
zjedna@post.cz*

Polyfenoly jsou bohatě zastoupeny v ovoci, zelenině a v nápojích jako je káva nebo čaj. Obecně se jedná o pozitivně působící (cytoprotektivní) látky, jejich podíl v běžné potravě je relativně vysoký a považují se za velmi přínosné. Pozitivní vlastnosti těchto látek nemusí být jen výhradně antioxidační, ale mohou se zapojovat do regulace exprese proteinů ovlivněním transkripce či translace. Například post-transkripční regulace pomocí mikroRNA se projeví na proteomu buňky, což vede k ovlivnění fenotypu. Vybrané polyfenoly: kyseliny kávová, gallová, a vanilová, kvercetin, taxifolin, silybin a dehydrosilybin byly testovány pro jejich schopnost ovlivnit globální expresi miRNA. Expresie mikroRNA byla sledována pomocí čipové technologie na buněčné línii HepG2 a primárních lidských hepatocytech. Použili jsme koncentraci 1  $\mu$ M, protože má zanedbatelnou toxicitu a je fyziologicky dosažitelná v lidském séru. Doba expozice byla 24 hodin. Naše data ukazují na určitou podobnost v ovlivnění exprese mikroRNA u strukturně podobných látek i celkově. Shlukovací analýza odhalila významnou podobnost v ovlivnění mikroRNA kyselinou gallovou a silybinem. Některé ovlivněné mikroRNA se podílejí na epigenetických změnách regulací DNA methyltransferasy (miR-29c, miR-301b), expresi cyklinu D3 (miR-138-2) nebo exprese Bcl2 a CREB (miR-34b). Expresie některých mikroRNA byly zvýšeny nebo sníženy podobně u HepG2 i primárních lidských hepatocytů. Závěrem konstatujeme, že fyziologicky dosažitelná koncentrace vybraných polyfenolů může způsobit změny v expresi mikroRNA u lidí.

*Tato práce vznikla za podpory grantů IGA\_LF\_2014\_014 a CZ.1.05/2.1.00/01.0030.*

## INŽENÝRSTVÍ METABOLICKÉ DRÁHY PRO BIODEGRADACI ANTROPOGENNÍHO POLUTANTU METODAMI SYNTETICKÉ BIOLOGIE

**PAVEL DVOŘÁK<sup>a,b</sup>, NAGENDRA P. KURUMBANG<sup>a</sup>, JAROSLAV BENDL<sup>a,c</sup>, JAN BREZOVSKÝ<sup>a</sup>, ZBYNĚK PROKOP<sup>a,b</sup>, JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Loschmidovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a RECETOX, PřF MU, 62500, Brno; <sup>b</sup>FNUSA-ICRC, 65691 Brno; <sup>c</sup>Ústav informačních systémů, FIT VUT, 61200, Brno  
paveld@chemi.muni.cz

Metabolické inženýrství přitahuje v posledních dvou dekáдах pozornost vědecké komunity i průmyslu především pro svůj potenciál při produkci látek s velkou přidanou hodnotou či biodegradaci toxických polutantů pomocí geneticky upravených hostitelských organismů. Komplexita metabolických dějů v živé buňce byla však doposud překážkou pro racionální design přírodních i syntetických metabolických drah. Rozvoj metod syntetické biologie, počítačového modelování a nových analytických technik dnes umožňuje studium multienzymových reakcí v podmínkách *in silico* a *in vitro*. Získané znalosti je možné následně uplatnit i pro optimalizaci funkce studovaných metabolických drah ve vhodném hostitelském organismu *in vivo*.

V našem projektu jsme tento postup uplatnili při inženýrství syntetické metabolické dráhy pro biodegradaci toxického antropogenního polutantu 1,2,3-trichlorpropanu v bakterii *Escherichia coli*<sup>1</sup>. Funkce metabolické dráhy složené ze tří enzymů původem ze dvou různých mikroorganismů byla nejprve testována v podmínkách *in vitro*<sup>2</sup>. Aktivita enzymu katalyzujícího první reakci v dráze byla zlepšena pomocí proteinového inženýrství<sup>3</sup>. Z kinetických parametrů jednotlivých enzymů jsme sestavili matematický model<sup>4</sup>, který byl využit pro simulace dynamického chování dráhy za různých podmínek umožňující její optimalizaci.

Matematický model jsme následně použili i pro racionální design dráhy v *E. coli*<sup>5</sup>. Na základě *in silico* simulací jsme optimalizovali expresi tří enzymů, zlepšili životaschopnost hostitelského organismu v přítomnosti toxického substrátu, definovali hlavní limitní krok syntetické dráhy a navrhli postup pro její další optimalizaci. Naše studie tak prezentuje nový koncept racionálního inženýrství syntetických metabolických drah.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P503/12/0572 a grantu Evropského regionálního fondu rozvoje CZ.1.05/1.1.00/02.0123.

### LITERATURA

1. Bosma T., Damborský J., Stucki G., Janssen D. B.: Appl. Environ. Microbiol. 68, 3582 (2002).
2. Dvořák P., Bidmanová Š., Damborský J., Prokop Z.: Env. Sci. Tech. under review (2014).
3. Pavlová M., Klvaňa M., Prokop Z., Chaloupková R., Banáš P., Otyepka M., Wade R. C., Tsuda M., Nagata Y., Damborský J.: Nat. Chem. Biol. 5, 727 (2009).
4. Dvořák P., Kurumbang N. P., Bendl J., Brezovský J., Prokop Z., Damborský J.: in preparation (2014).
5. Kurumbang N.P., Dvořák P., Bendl J., Brezovský J., Prokop Z., Damborský J.: ACS Synth. Biol. DOI: 10.1021/sb400147n (2014).

## K<sup>+</sup> TRANSPORTÉRY KVASINEK RODU *Candida*

**HANA ELICHAROVÁ, HANA SYCHROVÁ**

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
sychrova@biomed.cas.cz

Několik desítek druhů kvasinek rodu *Candida* jsou oportunní patogeny způsobující četné infekce sliznic a především závažné systémové infekce s vysokou mortalitou u imunokompromitovaných pacientů. Většina klinicky nejvýznamnějších druhů v čele s *C. albicans* jsou blíže příbuzné diploidní organismy patřící do kladu CUG, u kterých tento kodon značí serin místo kanonického leucinu. Naproti tomu klinicky velmi významný druh *C. glabrata* svým častým výskytem a obvyklou rezistencí k azolovým antimykotikům je organismus haploidní, blíže příbuzný s modelovým druhem *Saccharomyces cerevisiae*.

Draslík je hlavní vnitrobuněčný kationt všech živých buněk, kvasinky nevyjímaje. Zatímco intracelulární koncentrace K<sup>+</sup> u kvasinek se pohybuje mezi 200 mM a 300 mM, extracelulární koncentrace K<sup>+</sup> je typicky o dva řády nižší. Patogenní kvasinky tak kompetují s buňkami hostitele o draslík dostupný v krvi a plazmě, jehož koncentrace se pohybuje mezi 4-5 mM.

V naší práci jsme se zaměřili na *in silico* analýzu transportérů importujících K<sup>+</sup> u osmi klinicky nejvýznamnějších druhů *Candida* a *Saccharomyces cerevisiae* jako modelového organismu. Do současnosti byly u kvasinkových organismů popsány čtyři různé systémy s prokázanou importní aktivitou pro draselné kationty (TRK, HAK, ACU a KCH). Námi vytvořený cluster orthologů zahrnuje 28 genů a 2 pseudogeny. Z tohoto počtu je pouze 6 genů ověřených (většina pouze u *S. cerevisiae*). Důkladná analýza kódujících sekvencí by měla předcházet a ulehčit experimentální práci vedoucí k objasnění funkce jednotlivých transportérů. Vzhledem k tomu, že některé výše zmiňované systémy se vyskytují výlučně u kvasinkových organismů a u žádného dosud nebyla popsána podobnost s transportéry živočišných buněk, jeví se tyto transportéry jako slibný cíl potenciálních antimykotik.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA CR P302/12/1151.

## D14Abb1e – TRACKING DOWN A PUTATIVE SUPPRESSOR OF VARIATION

**VERONIKA GREŠÁKOVÁ<sup>a,b</sup>, SLAVOMIR KINSKY<sup>a</sup>, RADISLAV SEDLÁČEK<sup>a,c</sup>, TREVOR EPP<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratory of transgenic models of diseases, IMG ASCR, 142 20 Prague 4, <sup>b</sup>Faculty of Medicine, Palacky University, 771 26 Olomouc, <sup>c</sup>Czech Centre for Phenogenomics (BIOCEV/IMG), IMG AS CR, 142 20 Prague 4  
veronika.gresakova@img.cas.cz

Formation of heterochromatin is important for many aspects of nuclear function, including suppression of endogenous retroviruses, control of gene-dosage, and silencing of genes affected by DNA damage (senescence



associated heterochromatic foci). In order to identify genes important for heterochromatin formation, an ENU (*N-ethyl-N-nitrosurea*) mutagenesis screen was conducted on a transgenic mouse line containing a GFP reporter transgene that exhibits variegated expression in erythrocytes<sup>1</sup>. Mutants that suppress or enhance variegation were termed *Modifiers of Murine Metatable Epialleles (Momme)* and to date, more than 40 mutant mouse lines have been identified in the dominant screen.

The underlying causative mutations have been identified for many of the *Momme* mutants, and most correspond to genes well-known for their role in heterochromatin formation (e.g. *Dnmt1*, *Dnmt3b*, *Hdac1*, *Snf2h* etc.). However, one gene identified twice in the screen (*MommeD6* and *MommeD20*) remains largely unknown – D14Abb1e. The *MommeD6* line contains a nonconservative substitution and the *b* line contains a splice site mutation<sup>2</sup>. Both are homozygous lethal during gastrulation with compound heterozygosity replicating the homozygous phenotype.

Our goal is to identify the molecular function of D14Abb1e and understand its possible role as a suppressor of variegation. Preliminary results from our yeast 2-hybrid screen suggests that D14Abb1e could indeed be associated with chromatin remodeling complexes.

*This work was supported by AS CR (RVO 68378050), and by Ministry of Education, Youth and Sports, CR (OP RDI CZ.1.05/1.1.00/02.0109 (BIOCEV)), and OPVK projects CZ.1.07/2.3.00/20.0102 and CZ.1.07/2.3.00/30.0027.*

#### REFERENCES

1. Daxinger L., Harten S.K., Oey H., Epp T., Isbel L., Huang E., Whitelaw N., Apendaile A., Sorolla A., Yong J., Bharti V., Sutton J., Ashe A., Pang Z., Wallace N., Gerhard D., Blewitt M.E., Jeddeloh J. A., Whitelaw E.: *Genome Biol.* 14, R97 (2013).
2. Harten S.K., Bruxner T.J., Bharti V., Blewitt M., Nguyen T., Whitelaw E., Epp T.: submitted.

#### LOKALIZACE DVOJNÝCH VAZEB U TRIACYLGLYCEROLŮ POMOCÍ HPLC/APCI-MS<sup>2</sup>

**EVA HÁKOVÁ<sup>a,b</sup>, VLADIMÍR VRKOSLAV<sup>a</sup>, JOSEF CVAČKA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 166 10 Praha 6 [hakova@uochb.cas.cz](mailto:hakova@uochb.cas.cz)

Triacylglyceroly (TGs) se řadí k jedné z nejhodněji zastoupených lipidových tříd u rostlin i živočichů<sup>1</sup>. Jejich chemicko-fyzikální vlastnosti i biologická aktivita úzce souvisí se stupněm nenasycenosti a polohou dvojných vazeb v acylech<sup>2</sup>. Lokalizace dvojných vazeb v nenasycených sloučeninách je značně obtížná, zvláště pokud obsahují dlouhé řetězce nebo pokud jsou součástí komplexních směsí či se vyskytují ve vzorku ve velice malém množství<sup>3</sup>.

Většina metod pro lokalizaci dvojných vazeb využívá elektronovou ionizaci (EI), nejčastěji s využitím přístrojů pro plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí (GC/MS). Tyto techniky umožňují analyzovat též i tepelně stabilní lipidy nebo jejich deriváty. Proto jsou vzorky, které tyto podmínky nespĺňují, podrobené hydrolyze, což vede ke ztrátě informací o tom, jak byly mastné kyseliny (FA) původně v lipidech vázány<sup>3</sup>. Námí nově vyvinutá metoda pro lokalizaci dvojných vazeb v TGs využívá tandemovou hmotnostní spektrometrii s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Polohu dvojných vazeb je možné určit pomocí radikalkationtu C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sup>+</sup> (m/z 55), který vzniká reakcí acetonitrilu v APCI zdrojích. V APCI-MS/MS spektru lze pozorovat adukty [M+55]<sup>+</sup> a jejich fragmenty, které odpovídají štěpení C-C vazeb v okolí původní dvojných vazeb<sup>3,4</sup>.

Pro studium poloh dvojných vazeb bylo využito komerčně dostupných standardů a také standardů připravených procesem randomizace (interesterifikace) v mikroměřítku. Standardy se lišily délkou uhlovodíkového řetězce, polohou i počtem dvojných vazeb. Analýza regioisomerů TGs poskytla informace také o polohách FAs na glycerolovém řetězci. Aplikovatelnost této metody byla dále studována při analýze TGs v rostlinných olejích a novorozeneckém mázku.

*Tato práce vznikla za podpory SVV260084 a grantu GAČR P206/12/0750.*

#### LITERATURA

1. Laakso P.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 43 (2002).
2. Mitchell T. W., Pham H., Thomas M. C., Blanksby S. J.: *J. Chromatogr., B* 877, 2722 (2009).
3. Vrkoslav V., Háková M., Pecková K., Urbanová K., Cvačka J.: *Anal. Chem.* 83, 2978 (2011).
4. Háková E.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2013.

#### MIKROSKOPIA ATOMÁRNÝCH SÍL AKO ÚČINNÝ NÁSTROJ SLEDOVANIA VÁZBY NÁDOROVÉHO SUPRESORU BRCA1 (444-1057) NA LOKÁLNE DNA ŠTRUKTÚRY

**LUCIA HÁRONÍKOVÁ, VÁCLAV BRÁZDA**

*Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno [luh@ibp.cz](mailto:luh@ibp.cz)*

Rakovina prsníku a vaječníků je často spojená s poškodením génu pre tumorový supresor BRCA1, ktorý sa podieľa na mnohých bunkových procesoch. Funkciu proteínu BRCA1 zabezpečuje interakcia s mnohými proteínmi a taktiež väzba k DNA. U tohto proteínu bola pozorovaná preferenčná väzba na superhelikálnu DNA s potenciálom tvoriť križovú formu[1]. Výskyt netypických štruktúr DNA in vivo, ako sú križová forma, triplex, kvadruplex, zohráva významnú úlohu v regulácii bunkových procesov.

Študovali sme fragment proteínu BRCA1 (444-1057) viazaný k plazmidovej DNA s vloženými sekvenciami s potenciálom tvoriť krížovú formu, triplex a kvadruplex. Pomocou mikroskopie atomárných síl boli zobrazené jednotlivé formy DNA a taktiež komplexy s proteínom. Proteín BRCA1 sa viazal k DNA najmä vo forme oligomérnych komplexov s preferenciou pre lokálne štruktúry. Pomery naviazaného proteínu k rôznym plazmidom boli štatisticky vyhodnotené. Pri molárnom pomere väzby DNA k proteínu 1:20 sa na 1000 molekúl DNA viaže proteín BRCA1 (444-1057) o 20 % viac k superhelikálnej ako k lineárnej forme plazmidu pBluescript. Taktiež boli vyhodnotené objemy komplexov proteínu viazaného na DNA. Výsledky z mikroskopie atomárných síl sú podporené väzbovými experimentmi proteínu BRCA1 s plazmidmi na agarózovom géle.

Zobrazenie komplexov proteínu BRCA1 s DNA na úrovni jednotlivých molekúl je veľkým prínosom pri charakterizovaní väzby. Dôkladné poznanie väzbových vlastností tumorového supresoru BRCA1 môže viesť k lepšiemu porozumeniu funkcie tohto proteínu zapojeného do mnohých regulačných dráh a k porozumeniu významu tohto proteínu u nádorových ochorení.

#### LITERATÚRA

- Brázda V., Jagelská E. B., Liao C. C. J., Arrowsmith Ch. H.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27, 97 (2009).

### SUPRAMOLEKULÁRNÍ INTERAKCE ORGANICKÝCH ANIONTŮ S BAMBUSURILEM ZPROSTŘEDKOVANÉ MOLEKULAMI VODY

#### VÁCLAV HAVEL, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ

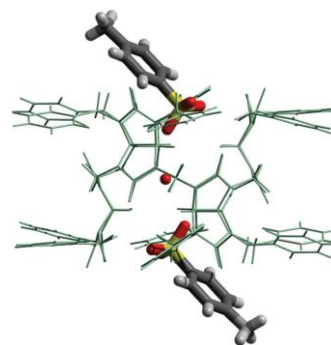
Ústav chemie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Kamenice 5, 625 00 Brno  
223301@mail.muni.cz

Supramolekulární interakce molekul vody jsou velmi důležité, jak v přírodních systémech (terciární struktura proteinů)<sup>1</sup>, tak v syntetických systémech (molekulární kapsle tvořené resorciareny a nebo pyrogallolareny)<sup>2</sup>.

Do skupiny takovýchto systémů je nyní možné započítat také supramolekulární komplexy bambusurilů, protože vznik určitých komplexů s vyšší stechiometrií je možný pouze v přítomnosti vody vázané v kavitě makrocycly<sup>3</sup>.

Bambusurily jsou skupinou supramolekulárních receptorů aniontů připravovanou kyselé katalyzovanou reakcí substituovaných glykolurilů s formaldehydem<sup>4</sup>.

V nedávno publikované práci jsme demonstrovali jejich schopnost tvořit komplexy s organickými anionty (benzoát, *p*-toluensulfonát), ale pouze pokud rozpouštědlo obsahuje molekuly vody, které zprostředkovávají tuto interakci<sup>3</sup>. V tomto případě pak vzniká supramolekulární struktura, kde jedna molekula vody uprostřed molekuly makrocycly zprostředkovává interakce mezi dvěma molekulami hostů (obr. 1).



Obr. 1. Krystalová struktura tosylátového komplexu bambusurilu. Molekuly rozpouštědla a TBA protiontů byly vynechány pro lepší přehlednost

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (13-15576S), AMVIS/KONTAKT II (LH11012), projektu CETOCOEN (no. CZ.1.05/2.1.00/01.0001) z Evropského fondu pro regionální rozvoj a programu Brno Ph.D. Talent, financovaného statutárním městem Brno.

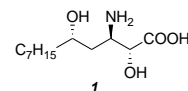
#### LITERATURA

- Dill K. A.: *Biochemistry* 29, 7133 (1990).
- Avram L., Cohen Y., Rebek Jr. J.: *Chem. Commun.* 47, 5368 (2011).
- Havel V., Šindelář V., Nečas M., Kaifer A. E.: *Chem. Commun.* 50, 1372 (2014).
- Švec J.; Nečas M.; Šindelář V.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2378 (2010).

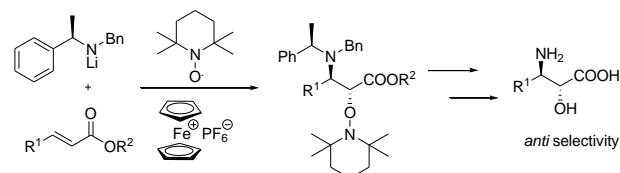
### ASYMMETRIC SYNTHESIS OF $\beta$ -AMINO- $\alpha$ -HYDROXY ESTERS: APPLICATION TO THE SYNTHESIS OF THE UNUSUAL LARGAMIDE H AMINO ACID

#### DENISA HIDASOVÁ, ULLRICH JAHN\*

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



Non-ribosomal amino acid in Largamide H



R<sup>1</sup> = Me, Et  
R<sup>2</sup> = <sup>t</sup>Bu

Marine cyanobacteria are fruitful producers of natural products with broad spectrum of biological activity including anticancer, antibiotic, antifungal, antiviral and proteinase-

inhibiting activity<sup>1,2</sup>. All these compounds are for this reason attractive targets for biomedical research. Largamide H is an unique member of the family of peptides and decapeptides containing a 2,5-dihydroxylated  $\beta$ -amino acid moiety *I*.

Here, a methodology is reported which allows a general approach to *anti*- $\beta$ -amino- $\alpha$ -hydroxy acid derivatives, which is applied in a short total synthesis of the natural amino acid *I*. The key step is based on a tandem asymmetric conjugate addition of chiral lithium amides to  $\alpha,\beta$ -unsaturated esters/SET oxidation/radical oxygenation.

*This work is supported by a grant from GA ČR (reg. n. 13-40188S) and the Gilead Sciences & IOCB Research Centre.*

#### REFERENCES

1. Plaza A., Bewley A. C.: J. Org. Chem. 71, 6898 (2006).
2. Liang S., Xu Z., Ye T.: Chem. Commun. 46, 153 (2010).

#### MODIFIKACE POVRCHU „PHOTON-UPCONVERTING“ NANOCÁSTIC PRO PŘÍPRAVU BIODONJUGÁTŮ

**ANTONÍN HLAVÁČEK<sup>a,b</sup>, ANDREAS SEDLMEIER<sup>a</sup>,  
PETR SKLÁDAL<sup>b</sup>, HANS H. GORRIS<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Analytical Chemistry, Chemo- and Biosensors, University of Regensburg, 93040 Regensburg, Germany;  
<sup>b</sup>CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, 601 77 Brno  
ahlavacek@mail.muni.cz

Unikátní anti-Stokesova luminiscence „photon-up-converting“ nanočástic (UCNP) dává nové možnosti ve vývoji bioanalytických metod, metod pro biologická zobrazování i fotodynamickou terapii<sup>1</sup>. Povrch UCNP i jiných typů nanočástic se obvykle modifikuje nanesením křemičité vrstvy. Tuto vrstvu lze následně upravovat zavedením funkčních skupin zajišťujících stabilitu, biokompatibilitu a umožňujících přípravu biodonjugátů s proteiny, nukleovými kyselinami a jinými biomolekulami. Kontrola procesu vytvoření křemičité vrstvy je však obtížná, proto jsou hledány nové metody umožňující monitorovat růst křemičité vrstvy, analyzovat její tloušťku a monodispersitu vznikajících nanočástic.

Gelová elektroforéza je jedním z nejdůležitějších nástrojů pro analýzu a purifikaci biomolekul, nanočástic i jejich biodonjugátů<sup>2-4</sup>. Obtížná detekce křemičitého obalu i nedostatek přístrojů pro detekci UCNP však dosud bránily využití gelové elektroforézy pro studium těchto nanočástic. Zde popsané metody tento problém překonávají a umožňují detekci modifikovaných UCNP pomocí standardní elektroforetické instrumentace; velikost vznikajících nanočástic, polydispersita i přítomnost agregátů tak může být snadno analyzována. Popsaná metoda byla použita pro optimalizaci syntézy vysoce monodisperzních UCNP s extrémně tenkou povrchovou křemičitanovou vrstvou, která je potřebná pro zvýšení citlivosti imunochemických stanovení. Vytvořený povrch nesoucí karboxylové skupiny umožňuje také snadnou konjugaci protilátek. Lze předpokládat, že vyvinutá metoda

najde uplatnění i při vývoji přesně definovaných nanočástic využitelných pro biologická zobrazování a fotodynamickou terapii.

*Práce byla podpořena z programu CZ.1.07/2.3.00/30.0009, a z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR a dále „German Academic Exchange Service“ (DAAD).*

#### LITERATURA

1. Gorris H. H., Wolfbeis O. S.: Angew. Chem. Int. Ed. 52, 3584 (2013).
2. Hlavacek A., Bouchal P., Skladal P.: Microchim. Acta 176, 287 (2012).
3. Hlavacek A., Skladal P., Electrophoresis 33, 1427 (2012).
4. Pyell U. Electrophoresis 31, 814 (2010).

#### PŘÍPRAVA A STUDIUM VLASTNOSTÍ KAPALNĚ KRYSTALICKÝCH DIMERŮ TVARU W

**MARTIN HORČÍK, JIŘÍ SVOBODA, VÁCLAV KOZMÍK, VLADIMÍRA NOVOTNÁ**

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; FÚ AV ČR, v. v. i., Na Slovance 1999/2, 182 21 Praha 8  
horcim@vscht.cz

Kapalné krystaly jsou materiály proslavené především díky kapalně krystalickým displejům (LCD). Uplatnění však nachází i v jiných zařízeních. Kapalně krystalické dimery jsou předmětem zájmu hlavně jako strukturně definované modely pro kapalně krystalické polymery a jako potenciální mesogeny vykazující biaxiální nematickou fázi. Studium dimerů lomených mesogenů bylo ukázáno, že nejzásadnější vliv na mesomorfní chování má typ spojovacího řetězce<sup>1-4</sup>.

V rámci projektu jsme připravili nové kapalně krystalické dimery tvaru **W** (Schéma 1), u kterých jsme se pokusili strukturními změnami modifikovat jejich mesomorfní vlastnosti. Modifikace se týkala délky vnitřních alkylových řetězců, typu polárních spojek, typu terminálních flexibilních řetězců a též záměny centrálních spojovacích jader.

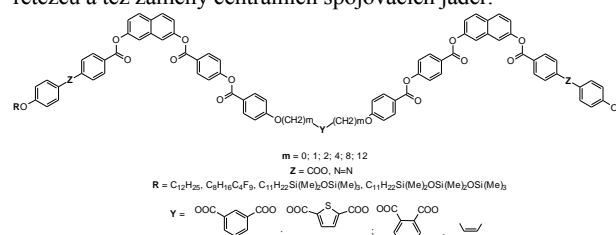


Schéma 1. Obecná struktura připravených dimerů

Mesomorfní chování bylo studováno polarizační optickou mikroskopií a diferenční skenovací kalorimetrií.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR (projekt č. P204/11/0723 and 13-14133S).*

#### LITERATURA

1. Kořata B., Tamba G. - M., Baumeister U., Pelz K., Diele S., Pelzl G., Galli G., Samaritani S., Agina E. V.,

- Boiko N. I., Shibaev V. P., Weissflog W.: Chem. Matter. 18, 691 (2006).
- Umadevi S., Sadashiva B. K., Murthy H. N. S., Raghunathan V. A.: Soft Matter 2, 210 (2006).
  - Achten R., Koudijs A., Giesbers M., Marcelis A. T. M., Sudhölter E. J. R., Schroeder M. W., Weissflog W.: Liq. Cryst. 34, 59 (2007).
  - Dantlgraber G., Diele S., Tschierske C.: Chem. Commun. 2002, 2768.

### N-(PYRONÍN-9-YLIDÉN)AMIDY: NOVÁ SKUPINA FLUOROFOROV S EXTRÉMNE VYSOKÝM STOKESOVÝM POSUNOM

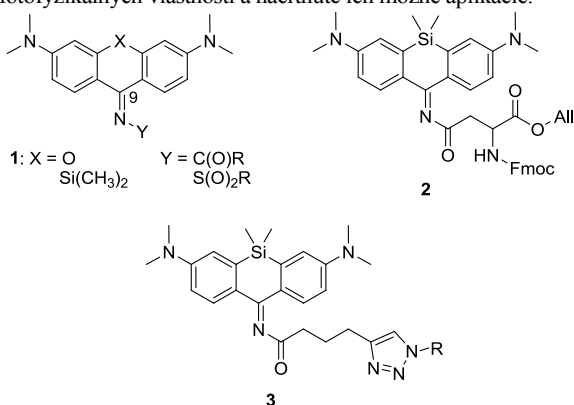
**PETER HORVÁTH, PETER ŠEBEJ, PETR KLÁN\***

RECETOX a Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
horvath@mail.muni.cz, \*klan@sci.muni.cz

Je popísané len malé množstvo fluorescenčných farbív pyronínového typu obsahujúcich dusík v polohe C9 (cit.<sup>1,2</sup>). Odpovedajúce C9-acylimino deriváty doteraz nie sú známe.

Navrhli a konvenčnými syntetickými metódami sme pripravili nové fluorescenčné farbivá **1** z kľúčového intermediátu – 9-aminopyronínu. Táto metodológia umožňuje priame pripojenie na karboxylovú skupinu cieľovej biomolekuly **2** alebo pripojenie pomocou vhodnej bioortogónnej skupiny **3** za vzniku N-(pyronín-9-ylidén)amidového fluoroforu. Tieto zlúčeniny vykazujú mimoriadne vysoké Stokesove posuny (>200 nm), vysoké kvantové výťažky fluorescencie a dobrú fotostabilitu.

V príspevku budú diskutované možnosti prípravy popisovaných zlúčenín, racionalizované trendy ich fotofyzikálnych vlastností a načrtnuté ich možné aplikácie.



Táto práca vznikla za podpory grantov poskytnutých GA ČR (13-25775S), Recetox (projekty CETOCOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001, CZ.1.07/2.3.00/30.0037) a AXA Fond.

#### LITERATÚRA

- Wu L., Burgess K.: Org. Lett. 10, 1779 (2008).
- Zilles A., Drexhage K. H., Kemnitzer N. U., Arden-Jacob J., Hamers-Schneider M.: PCT Intl. Patent Appl. Publ. WO/2012/052435, 26 April 2012.

### SYNTÉZA NOVÝCH VYSOCE FLUOROVANÝCH ANALOG HOVEYDOVA-GRUBBSOVA KATALYZÁTORU DRUHÉ GENERACE

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

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

Separční techniky lehké a těžké fluorové chemie jsou velmi užitečným nástrojem pro oddělení polyfluorovaných substrátů od nefluorovaných. Tyto metody lze s výhodou využít pro recyklaci nákladného katalyzátoru, jakým je např. Hoveydův-Grubbsův katalyzátor 2. generace, který se využívá pro metatezní reakce.

V naší laboratoři se zabýváme syntézou nových polyfluorovaných analog rutheniových komplexů, které budou vysoce fluorofilní a současně si zachovají reaktivitu podobnou komerčně dostupným katalyzátorům<sup>1</sup>. Nedávno nám podařilo připravit komplexy **I-III**, jejichž společným prvkem je substituce v pozici 4 a 5 imidazolidinového cyklu (Schéma 1).

Klíčovým krokem syntézy byla adice 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluoroktyllithia na *N,N'*-dimesitylethandiylidendiamin. Tato reakce byla překvapivě vysoce stereoselektivní, protože vznikl výhradně *threo*-isomer. Racemický diamin byl v následujícím kroku zacyklen reakcí s triethylorthoformiátem. Takto připravená dihydroimidazoliolová sůl poskytla reakci s Hoveydovým-Grubbsovým katalyzátorem 1. generace (R<sup>1</sup> = H nebo C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>) fluorované komplexy **I** a **II**. Vysoce fluorofilní komplex **III** byl následně připraven z komplexu **I** substitucí chloridových ligandů za perfluor-3,6-dioxaheptanoáty. Aktivita připravených katalyzátorů byla úspěšně testována v modelových metatezích alkenů.

Modifikací výchozího diiminu je pak možné připravit celou řadu katalyzátorů nesoucích navíc polyfluorované řetězce na aromatických jádrech NHC ligandu.

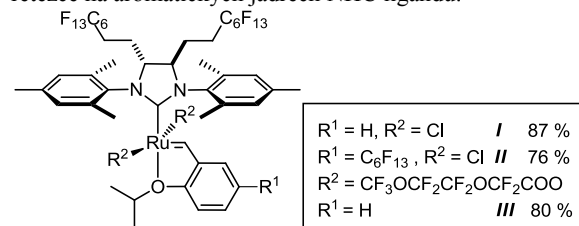


Schéma 1. Nové rutheniové komplexy **I-III**

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

#### LITERATURA

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

## VLIV STRUKTURY GERANYLOVANÝCH A PRENYLOVANÝCH FLAVONOIDŮ NA JEJICH ANTIFLOGISTICKOU AKTIVITU

**JAN HOŠEK, ZUZANA HANÁKOVÁ, PETR BABULA, JIŘÍ VÁCLAVÍK, KAREL ŠMEJKAL**

*Farmaceutická fakulta VFU, Palackého tř.1/3, 612 42 Brno  
hosekj@vfu.cz*

Flavonoidy jsou přirozeně se vyskytující rostlinné sekundární metabolity, které v nich zastávají mnoho významných funkcí (např. antibakteriální agens)<sup>1</sup>. V současnosti je však největší pozornost věnována jejich antioxidantnímu a protizánětlivým účinkům uplatňovaným v klinické praxi. Přítomnost alifatických postranních řetězců zvyšuje jejich lipofilitu a tím do značné míry modifikuje jejich biologickou aktivitu.

Pro účely této studie byly vybrány flavonoidy izolované z paulovnie plstnaté [*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Siebold et Zucc. ex Steud. (Paulowniaceae)], a to 12 nových (**I-XXII**) a 11 již známých flavonoidů s alifatickým postranním řetězcem (**XIII-XXIII**).

Tato práce si kládla za cíl ověřit protizánětlivý potenciál všech 23 izolovaných flavonoidů na buněčném modelu lidské buněčné linie THP-1 a identifikovat strukturální motivy daných látek, které jsou zodpovědné za tento efekt. U vybraných aktivních látek byl také zkoumán mechanismus účinku.

Pro iniciační screeningový test byl využit zánětlivý *in vitro* model lipopolysacharidem (LPS) stimulovaných buněk THP-1. Po indukci zánětlivé reakce byla detegována schopnost testovaných látek snižovat sekreci pro-zánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$ . Bylo zjištěno, že lipofilita částečně ovlivňuje anti-flogistickou aktivitu, ale větší vliv vykazovala změna substituce postranního řetězce a B-kruhu. U látek vykazujících signifikantní biologickou aktivitu (**IV**, **VII**, **X**, **XIV**, **XXII**) byly detailněji zkoumány mechanismy účinku. Bylo zjištěno, všechny tyto látky kromě sekrece TNF- $\alpha$  snižují i jeho transkripci na úrovni mRNA. V dalších experimentech bylo zjištěno, že látky **IV**, **VII**, **X**, **XIV** a **XXII** inhibují jadernou translokaci NF- $\kappa$ B, který řídí transkripci TNF- $\alpha$  skrze blokování degradace proteínu I $\kappa$ B, který inaktivuje tento transkripční faktor.

Tato práce potvrdila oprávněnost využívání rostlinných extraktů bohatých na flavonoidy v lidovém léčitelství jako antiflogistik. Zkoumané látky vykazovaly výrazný protizánětlivý účinek, který je alespoň z části způsoben blokováním signální dráhy NF- $\kappa$ B.

*Tato práce vznikla za podpory OP pro vzdělání a konkurenceschopnost (č. CZ.1.07/2.3.00/30.0014) a grantů IGA VFU Brno číslo 74/2012/FaF a 12/2010/FaF.*

### LITERATURA

- Han R. M., Zhang J. P., Skibsted L. H.: *Molecules* 17, 2140 (2012).

## RNF168 ZÁVISLÁ ODPOVEĎ NA DNA POŠKODENIE V PODMIENKACH NEDOSTATKU UBIKVITÍNU

**KATARÍNA CHROMÁ<sup>a</sup>, JURAJ KRAMARA<sup>a</sup>, PAVEL MOUDRÝ<sup>b</sup>, MARTIN MISTRÍK<sup>a</sup>, JIŘÍ BÁRTEK<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav molekulární a translační medicíny, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc; <sup>b</sup>Danish Cancer Society, Strandboulevarden 49, DK-2100 Kodaň, Dánsko  
katka.chr@gmail.com*

Syntéza a degradácia proteínov sú prísne regulované procesy esenciálne pre udržanie bunkovej homeostázy. Proteíny určené na degradáciu sú označené lineárnymi reťazcami malého polypeptidu-ubikvitínu a následne rozpoznávané multienzýmovým komplexom proteazómu, kde sú proteolyticky štiepené. Konjugácia proteínov s ubikvitínom zohráva aj dôležitú signálnu úlohu, a to predovšetkým v procese opravy DNA. Inhibícia katalytickej aktivity proteazómu špecifickými inhibítormi znemožňuje recykláciu ubikvitínu, dochádza k vyčerpaniu jeho hladiny v bunke a k zastaveniu ubikvitín závislých procesov vrátane signalizácie DNA poškodenia. Dôsledkom je absencia mnohých kľúčových proteínov dráh opravy DNA v miestach poškodenia. Medzi uvedené proteíny patria aj 53BP1 a BRCA1 hrajúce dôležitú úlohu v opravných dráhach NHEJ a HR.

V našej štúdií sa nám podarilo identifikovať viacero nádorových bunkových línii, u ktorých tento fenomén neplatí a proteín 53BP1 po kombinovanej aplikácii ionizačného žiarenia a inhibítora proteazómu v oblasti zlomov DNA čiastočne perzistuje. Pri objasňovaní príčin tohto zaujímavého fenotypu sme sa zamerali na hladinu expresie viacerých enzýmov ubikvitinačnej kaskády opravných dráh DNA. Nadobudnuté výsledky naznačili, že za fenotyp je pravdepodobne zodpovedná niekoľkonásobne zvýšená hladina E3 ubikvitín ligázy RNF168 v sledovaných líniiach. Koreláciu medzi perzistenciou 53BP1 v miestach poškodenia po inhibícii proteazómu a hladinou RNF168 potvrdili aj experimenty s čiastočným „knockdownom“ resp. nadexpresiou RNF168. Predpokladáme, že v prípade buniek so zvýšenou hladinou proteínu RNF168 sa po indukciu poškodenia DNA a súčasnej aplikácii inhibítora proteazómu preferenčne spúšťa na chyby náchylná oprava DNA-NHEJ licencovaná proteínom 53BP1.

Vzhľadom na to, že nadmerná oprava prostredníctvom NHEJ má za následok zvýšenie genómovej nestability vedúcej k bunkovej smrti, inhibícia proteazómu v kombinácii s chemoterapeutikami spôsobujúcimi poškodenie DNA (resp. s rádioterapiou) by sa dala využiť na selektívnu eradikáciu nádorových buniek vykazujúcich zvýšené hladiny E3 ubikvitín ligáz.

## STRUKTURNĚ-FUNKČNÍ STUDIUM LEKTINU PHL Z *Photorabdus asymbiotica* A JEHO VÝZNAM V PATOGENEZI

**GITA JANČAŘÍKOVÁ<sup>a,b</sup>, MICHAELA  
WIMMEROVÁ<sup>a,b,c</sup>**

<sup>a</sup>NCBR a <sup>c</sup>Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta,  
Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno;

<sup>b</sup>CEITEC, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
gita.jancarikova@mail.muni.cz

Lektiny tvoří významnou skupinu proteinů a glykoproteinů, která se díky jejich schopnosti specificky rozpoznávat a reverzibilně vázat glykokonjugáty účastní celé řady fyziologických a patologických procesů. Podílí se například na imunologických reakcích, interakcích buněk v tkáních, ale také na interakcích patogenů s hostitelem, což může být prvotním krokem v rozvoji infekci. V dnešní době mají také velmi široké uplatnění v celé řadě odvětví, jako např. biochemie, buněčná biologie nebo medicína, kde mohou sloužit pro detekci a charakterizaci různých sacharidových komponent glykokonjugátů, izolaci biomolekul, histologická vyšetření, stanovení krevních skupin a další.

Náš projekt je zaměřen na studium lektinu PHL z patogenní bakterie *Photorabdus asymbiotica*, který spadá společně s *Photorabdus luminiscens* a *Photorabdus temperata* do rodu *Photorabdus*. *P. luminiscens* a *P. temperata* jsou charakterizovány jako striktně hmyzí patogeny, oproti tomu je *P. asymbiotica* ještě navíc patogenem lidským způsobujícím především infekci měkkých tkání. PHL lektin byl vybrán na základě sekvenční podobnosti s lektinem z *P. luminiscens* a předpokládané strukturní podobnosti s lektiny z tzv. AAL rodiny, které se vyznačují svojí specificitou k fukose. Do této rodiny patří např. lektin z *Aleuria aurantia*, který inhibuje opravu epitelů, nebo lektin z *Ralstonia solanacearum*, který je jedním z klíčových faktorů virulence tohoto rostlinného patogena.

Pro strukturní a funkční charakterizaci PHL lektinu byla využita celá řada metod: rezonance povrchového plasmonu, isothermální titrační kalorimetrie, analytická ultracentrifugace, hemaglutinace, rentgenostrukturní analýza a další. Díky nim byla určena nejen sacharidová specificita lektinu, ale také jeho struktura, která odhalila přítomnost 14 možných vazebných míst. Oproti lektinům z AAL rodiny, které jsou charakteristické strukturou šestilopátkového  $\beta$ -propeleru, je PHL lektin unikátní a obsahuje těchto lopatek sedm. Díky získání proteinových krystalů s různými sacharidy byla také prokázána přítomnost dvou typů vazebných míst, do kterých jsou vázány ligandy s odlišnou polaritou. Stejně jako u příbuzných lektinů byla prokázána specificita k fukose, což může naznačovat jeho významnou roli v průběhu samotné infekce. Vazebné vlastnosti PHL budou dále studovány i s využitím složitějších sacharidů.

Tato práce vznikla za podpory projektu GAČR (13-25401S) a CEITEC – Středoevropský technologický institut (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z EF pro regionální rozvoj.

## TOPOIZOMERÁZOVÁ INHIBIČNÁ AKTIVITA VYBRANÝCH BISTAKRÍNOVÝCH DERIVÁTŮV

**JANA JANOČKOVÁ<sup>a</sup>, SLÁVKA HAMUŠÁKOVÁ<sup>b</sup>,  
JÁN KORÁBEČNÝ<sup>c</sup>, JANA KAŠPÁRKOVÁ<sup>d</sup>, VIKTOR  
BRABEC<sup>d</sup>, KAMIL KUČA<sup>c</sup>, MÁRIA KOŽURKOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Katedra biochemie, <sup>b</sup>Katedra organickej chémie, PrF  
Univerzita P. J. Šafárika, 041 01 Košice; <sup>c</sup>Katedra  
toxikológie, FVZ UO, 500 01 Hradec Králové; <sup>d</sup>Oddelenie  
mol. biofyziky a farmakológie, BFÚ AV ČR, 312 35 Brno  
jana.janockova@gmail.com

Topoizomerázy sú esenciálne enzýmy, ktorých hlavnou funkciou je zabezpečiť priebeh niektorých bunkových procesov. Vo všetkých bunkách sa vyskytujú dva základné typy topoizomeráz – topoizomerasa I a II, ktoré sa navzájom líšia mechanizmom účinku a svojimi biologickými funkciami<sup>1</sup>. Topoizomerázy sú dôležité pre bunkovú proliferáciu a ich inhibícia spôsobuje zastavenie bunkového cyklu a následne môže viesť až k bunkovej smrti. Inhibícia topoizomeráz je jedným z mechanizmov účinku cytotoxických a chemoterapeutických liečiv, ktorých protirakovinová aktivita sa spája s ich schopnosťou inhibovať topoizomerasu I, ktorá je kovalentne naviazaná na DNA. Kovalentný komplex topoizomerasa-DNA je stabilizovaný topoizomerázovými inhibítormi, čo nakoniec vedie k letálnemu poškodeniu DNA v priebehu replikácie<sup>2</sup>. Niektoré typy topoizomerázových inhibítorov sa v súčasnosti zaraďujú medzi potenciálne protirakovinové liečiva, napr. kamtotecínové deriváty (inhibítory topoizomerasy I), aminoakridínové a antracyklínové deriváty (inhibítory topoizomerasy II)<sup>3</sup>.

Táto práca je zameraná na testovanie topoizomerázovej inhibičnej aktivity série nových bis-takrínových derivátov (1-(x-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine-9-yl-amino)alkyl)-3-(1,2,3,4-tetrahydroacridine-9-yl)thiourea/urea, **I-XI**). Spôsob interakcie daných ligandov s ctDNA bol študovaný pomocou rôznych biofyzikálnych a biochemických metód (UV-Vis, fluorescenčná spektroskopia, cirkulárny a lineárny dichroizmus, viskozimetria). Topoizomerázový inhibičný účinok ligandov bol určený elektroforetickými separačnými metódami. Študované deriváty inhibovali topoizomerasu I pri 30  $\mu$ M koncentrácii. Z UV-Vis spektroskopických titrácií boli stanovené väzobné konštanty ligandov v komplexe s ctDNA ( $K = 0,3 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ ). Z experimentálnych výsledkov vyplýva, že nami študované ligandy sú schopné interakcie s ctDNA a ovplyvňujú aktivitu topoizomeráz.

Tato práca vznikla za podpory grantov VEGA grant I/0001/13 a VVGS-PF-2013-78.

## LITERATÚRA

1. Winkler D.: Bioorg. Med. Chem. 19, 1450 (2011).
2. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C.: Chem. Biol. 17, 421 (2010).
3. Hartmann J. T., Lipp H. P.: Drug Saf. 29, 209 (2006).

## PŘÍPRAVA A EVALUACE BIFUNKČNÍCH THIOMOČOVINOVÝCH ORGANOKATALYZÁTORŮ ODVOZENÝCH OD SACHARIDŮ A AMINOKYSELIN

IVANA JURÁSKOVÁ, JIŘÍ TAUCHMAN, JAN VESELÝ

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

Bifunkční thiomochovinové katalyzátory<sup>1</sup> obsahují mimo thiomochovinové skupiny ještě druhou funkční skupinu, většinou terciární amin nebo fosfin. Přítomnost dvou funkčních skupin jim umožňuje aktivovat současně obě komponenty chemické reakce, např. elektrofil i nukleofil v nukleofilní adiční reakci. Thiomochovinová skupina aktivuje elektrofilní komponentu reakce tvorbou vodíkových vazeb. Druhá funkční skupina aktivuje nukleofilní komponentu reakce a působí různým mechanismem. Terciární amin interaguje s vodíkovým atomem pronukleofilu, zatímco terciární fosfin se aduje na jeho násobnou vazbu. Tento komplexní způsob aktivace substrátů připomíná činnost enzymů v biologických systémech.

S ohledem na dosavadní poznatky v oblasti asymetrické organokatalýzy byly navrženy bifunkční thiomochovinové katalyzátory typu I obsahující terciární fosfin (schéma 1). Příprava těchto katalyzátorů vychází ze snadno dostupných a v biomase hojně zastoupených výchozích látek – D-glukosy a L-aminokyseliny. Důležitými meziproducty v námi navržené syntéze jsou glukopyranosylisothiokyanát II a aminofosfin III.

Připravené organokatalyzátory byly evaluovány v Morita-Baylis-Hillmanově reakci<sup>2</sup> aromatických aldehydů s alkylakryláty a alkyl-vinyl ketony (schéma 2). Postup přípravy katalyzátorů a výsledky dosažené při jejich evaluaci budou detailně diskutovány v příspěvku.

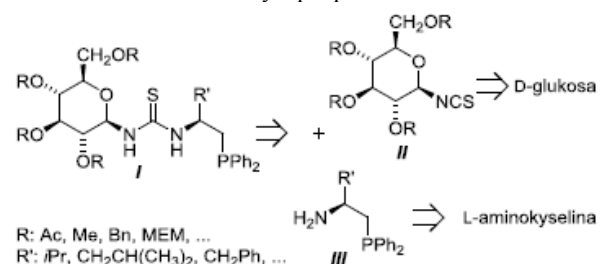


Schéma 1. Schéma přípravy bifunkčních organokatalyzátorů I

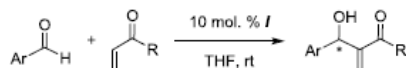


Schéma 2. Morita-Baylis-Hillmanova reakce

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 704213.

### LITERATURA

- Doyle A. G., Jacobsen E. N.: Chem. Rev. 107, 5713 (2007).
- Wei Y., Shi M.: Chem. Rev. 113, 6659 (2013).

## BIOFYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE FOSDUCINU A JEHO KOMPLEXU S VAZEBNÝM PARTNEREM – PROTEINEM 14-3-3

MIROSLAVA KACÍŘOVÁ<sup>a,b</sup>, LENKA ŘEŽÁBKOVÁ<sup>a,b</sup>,  
ALAN KÁDEK<sup>c</sup>, PETR MAN<sup>c</sup>, JIŘÍ NOVÁČEK<sup>d</sup>,  
JAROSLAV VEČEŘ<sup>e</sup>, MIROSLAV ŠTĚPÁNEK<sup>a</sup>,  
VERONIKA OBŠILOVÁ<sup>b</sup>, TOMÁŠ OBŠIL<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Katedra fyzikální a makromolekulární chemie PŘF UK, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Fyziologický ústav AV ČR, 142 20 Praha 4; <sup>c</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, 142 20 Praha 4; <sup>d</sup>Masarykova univerzita, CEITEC – Středoevropský technologický institut, 625 00 Brno; <sup>e</sup>MFF UK, 121 16 Praha 2  
kacirova@natur.cuni.cz

Fosducin (Pdc) je 28 kDa protein nacházející se v sítnici oka, v šišince a jí příbuzných tkáních, a v sympatických gangliích. Tento regulační protein je součástí kaskády přenosu světelného signálu v oku, kde reguluje jeho intenzitu. Regulaci funkce Pdc zajišťuje protein 14-3-3.

Funkce 14-3-3 nebyla v procesu doposud detailně specifikována. Předpokládá se, že by 14-3-3 mohl bránit tvorbě Pdc/G<sub>βγ</sub> vazbou Pdc, nebo bránit fosfatasam defosforylaci dvojité fosforylovaného Pdc (Pdc-dP), kde dP je nezbytná k vazbě Pdc se 14-3-3 a už pouhá „singlefosforylace“ zapříčiňuje rozpad Pdc/G<sub>βγ</sub>. Zdá se, že 14-3-3 interaguje s nestrukturovanou N-terminální doménou Pdc, kde se nachází nejen obě fosforylační místa, ale také sumoylační sekvence. 14-3-3 by v procesu sumoylace Pdc mohl tedy hrát roli.

Nášim cílem je biofyzikálně charakterizovat komplex Pdc-dP/14-3-3 a dále uvažovat o biologické relevanci. Technikou AUC jsme zjistili, že stechiometrický poměr Pdc-dP : 14-3-3 v komplexu je 1:2 a K<sub>d</sub> je 4 μM. Technikami časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie jsme popsali pohyby samotných molekul a komplexu. Nejvíce je vazbou ovlivněna N-terminální část Pdc, ale slabé interakce jsme pozorovali i v C-ter. doméně. Další námi používané techniky jsou H/D výměna spojená s MS, DLS, Bio-NMR, SAXS, zhášení tryptofanové fluorescence. Všechny tyto techniky nám shodně potvrzují chování obou proteinů v komplexu, a to, že N-ter. doména Pdc se zdá být v spíše nestrukturovaná a vazba 14-3-3 nemá na C-ter. doménu Pdc velký vliv. Vazba je slabá, ale pro její uskutečnění je nutná přítomnost obou fosfátů (S54, S73) na Pdc. N-ter. d. se při vazbě nachází ve vazebném žlábků 14-3-3, zatímco strukturovaná C-ter. doména vyčnívá ven.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR P305/11/0708, GA UK 28510, GA UK 793913 a projektů MSM0021620857, AV0Z50110509.

### LITERATURA

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

## SYNTÉZA NOVÉHO MOLEKULÁRNÍHO ROTORU PRO TVORBU POVRCHOVÝCH INKLUZÍ

JIŘÍ KALETA<sup>a</sup>, CHARLES T. ROGERS<sup>b</sup>, PAUL I. DRON<sup>c</sup>, JOSEF MICHL<sup>a,c</sup>

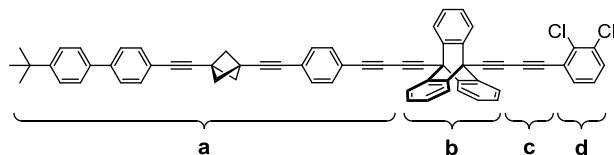
<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, 16610 Praha 6.

<sup>b</sup> Department of Physics and <sup>c</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Univ. of Colorado, Boulder, CO, 80309, U.S.A. kaleta@uochb.cas.cz

Náš výzkum je zaměřen na přípravu organizovaných polí navzájem interagujících molekulárních rotorů seřazených v trojúhelníkovitém uspořádání. Díky této geometrii mohou dané systémy vykazovat ferroelektrické vlastnosti následně využitelné např. v molekulární elektronice.

Celý koncept je založen na tvorbě inkluzních komplexů, kde hostem je vlastní molekulární rotor a hostitelskou strukturou je daný porézní povrch se známou topologií – v tomto případě hexagonální tris(*o*-fenyldioxy)cyclotrifosfazen (TPP). Pro tyto účely byl navržen a následně syntetizován rotor na bázi triptycenu (Obr. 1).

Vlastní rotor se skládá ze čtyř hlavních částí: (a) nepolární rigidní tělo na bázi bicyklo[1.1.1]penty/bifenyly, jehož úkolem je proniknout do prázdných kanálů TPP za vzniku inkluzního komplexu a zaručit tak, že vlastní rotor bude orientován kolmo k povrchu, (b) triptycenová zarážka, která zabrání tomu, aby se celý rotor nasoukal do TPP kanálů, (c) butadiynová spojka fungující jako osička a (d) dichlorfenylový rotátor s permanentním dipólovým momentem a nízkou vnitřní bariérou rotace.



Obr. 1. Struktura studovaného molekulárního rotoru.

V průběhu přednášky bude diskutována jak syntéza molekulárního rotoru, tak analýza inkluzního komplexu rotor@TPP a předběžná data získaná měřením dielektrických spekter.

*Tato práce vznikla za finanční podpory „European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) ERC grant agreement no. 227756“ a ÚOCHB AV ČR RVO: 61388963.*

## ALLYLACE $\beta$ -KETOESTERŮ POMOCÍ MORITA-BAYLIS-HILLMANOVÝCH (MBH) KARBONÁTŮ ZA VYUŽITÍ ASYMETRICKÉ ORGANOKATALÝZY

MARTIN KAMLAR, JAN VESELÝ

Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2 kamlar.m@centrum.cz

Asymetrická organokatalýza využívající malých organických molekul jako katalyzátorů se v posledních letech zařadila mezi komplementární metody pro přípravu enantiomerně čistých látek. Jedním z mnoha odvětví organické syntézy, kde se tento koncept uplatnil, je i allylová alkylace využívající derivátů Morita-Baylis-Hillmanových (MBH) aduktů (karbonátů či acetatů). Tento typ sloučenin reaguje za katalýzy chirálními fosfiny či terciárními aminy s řadou nukleofilů za vzniku chirální C-C, C-N, C-S či C-O vazby<sup>1</sup>.

V návaznosti na naši předešlou práci v oblasti organokatalýzy<sup>2</sup> jsme se rozhodli rozšířit využití MBH karbonátů **I** v oblasti asymetrických allylačních reakcí. Jako vhodné nukleofily byly vybrány stericky náročné, avšak dostupné  $\beta$ -ketoestery **II** odvozené od cyklopentanonu, indanonu a tetralonu, které jsme využili pro přípravu látek **III** obsahujících chirální kvarterní centrum. K indukci enantioselektivity byly využity komerčně dostupné katalyzátory odvozené od chinolinových alkaloidů.

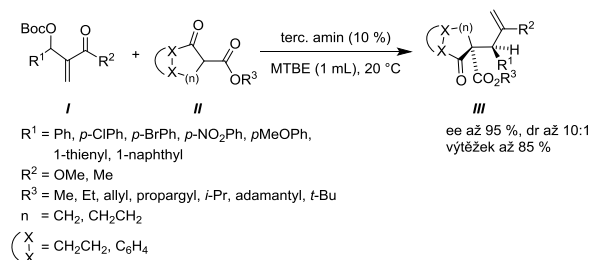


Schéma 1. Asymetrická allylace  $\beta$ -oxoesterů pomocí MBH karbonátů

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P207/10/0428 MŠMT MSM0021620857a GA UK 427011.*

### LITERATURA

- Liu T.-Y., Xie M., Chen Y.-Ch.: Chem. Soc. Rev. 41, 4101 (2012).
- Kamlar M., Putaj P., Veselý J.: Tetrahedron Letters 54, 2097 (2013).



## STUDIE K TOTÁLNÍ SYNTÉZE ENT-PROGESTERONU

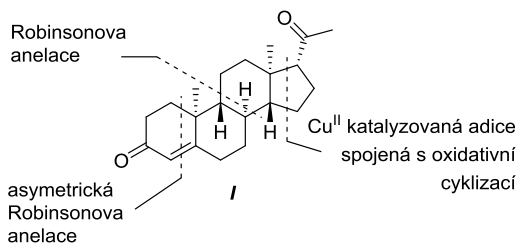
VOJTĚCH KAPRAS, ULLRICH JAHN

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

Steroidy se v přírodě nacházejí pouze v jedné enantiomerní formě díky konzervativním biosyntetickým cestám. Jasně definovaná vazebná místa jaderných receptorů zřetelně rozlišují mezi přirozenými (*nat-*) a enantiomerními (*ent-*) steroidy. Ukazuje se ovšem, že některé membránové receptory (např. GABA<sub>A</sub>) jsou ovlivňovány i opačnými enantiomery steroidů<sup>1</sup>, pravděpodobně skrze změnu vlastností membrány. *Ent*-steroidy tak tvoří zajímavý nástroj pro zkoumání vazby steroidů na receptor. Náš projekt navazuje na výzkum účinků neuroaktivních steroidů na NMDA receptor<sup>2</sup>. Tento příspěvek se zaměřuje na totální syntézu *ent*-progesteronu (**I**) jakožto prekurzoru k opačným enantiomerům neuroaktivních steroidů.

Retrosyntéza byla plánována s ohledem na možnou konstrukci různých postranních řetězců v pozdní fázi syntézy a také *nor*-derivátů postrádajících kruh D.

V syntéze jsme postupovali od kruhů A a B, snadno dostupných asymetrickou Robinsonovou anelací. Další Robinsonovou anelací byl připojen kruh C a molekula byla následně připravena pro klíčový krok: konjugovanou adici spojenou s oxidativní cyklizací. Zmíněná reakce zde byla použita poprvé a navazuje na koncept přechodu mezi polárním a radikálovým mechanismem v jednom reakčním kroku<sup>3</sup>. Zavedení druhého angulárního methylu pak završilo konstrukci steroidního skeletu s požadovanou stereochemií. Nově nalezená modulární syntetická cesta byla využita pro přípravu neuroaktivních sloučenin.

Schéma 1. *Ent*-progesteron a jeho retrosyntéza

Tato práce vznikla za podpory výzkumného centra Gilead a UOCHB AV ČR a grantu RVO: 61388963 (UOCHB AV ČR).

## LITERATURA

1. Covey D. F.: *Steroids* 74, 577 (2009).
2. Borovská J., Vyklický V., Stastna E., Kapras V., Slavikova B., Horak M., Chodounska H., Vyklicky L.: *Br. J. Pharmacol.* 166, 1069 (2012).
3. Jahn U., Müller M., Aussieker S.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5212 (2000).

## MITOCHONDRIÁLNÍ LOKALIZACE HIV-1 PROTEASY A JEJÍ POTENCIÁLNÍ ROLE VE VNITŘNÍ APOPTICKÉ DRÁZE

ALENA KEPROVÁ<sup>a,b</sup>, IVANA KRÍŽOVÁ<sup>b</sup>, ROMANA HADRAVOVÁ<sup>b</sup>, MIROSLAV HÁJEK<sup>b</sup>, MICHAELA RUMLOVÁ<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, 166 10 Praha 6, <sup>c</sup>Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha  
keprova@uochb.cas.cz

HIV-1 (z angl. Human Immunodeficiency Virus type 1) kóduje aspartátovou proteasu (PR), která štěpí virové polypeptidové prekurzory na jednotlivé funkční proteiny za vzniku zralé infekční částice. HIV-1 PR je schopna štěpit i řadu buněčných proteinů, které následně v buňce indukují apoptosu. Vztah mezi její katalytickou aktivou a úlohou v apoptose však zůstává stále nejasný.

Cílem této práce je určit vnitrobuněčnou lokalizaci HIV-1 PR exprimované v savčích HEK 293 či HeLa buněčných liniích, jež by mohla napomoci objasnit důsledky jejího cytotoxického účinku.

Sérií lyzačních a centrifugačních analýz byla z buněk exprimujících neaktivní HIV-1 PR postupně izolována cytosolická, mitochondriální a jaderná frakce. SDS-PAGE následovaná imunochemickou analýzou jednoznačně potvrdila přítomnost neaktivní HIV-1 PR v mitochondriích. Tato lokalizace byla potvrzena i fluorescenční a transmisní elektronovou mikroskopií.

Metodou řízené proteolýzy proteinasou K v přítomnosti či nepřítomnosti tritonu byla provedena submitochondriální lokalizace neaktivní HIV-1 PR. Bylo prokázáno, že exprese neaktivní HIV-1 PR vede ke štěpení mitochondriálních proteinů: Tomm22, VDAC a ANT. Pomocí průtokové cytometrie byly zjištěny změny v mitochondriálním membránovém potenciálu signalizující poškození mitochondrií způsobené aktivní HIV-1 PR.

Tyto poznatky by v budoucnu mohly přispět k hlubšímu pochopení role HIV-1 PR během apoptosy a napomoci tak při návrhu nových terapeutických postupů léčby infekce HIV.

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

## ANALÝZA VYBRANÝCH mikroRNA U GLIOBLASTOMOVÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

RENATA KLEINOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ ŠÁNA<sup>a,b</sup>, EVA DULAVOVÁ<sup>a</sup>, LEOŠ KRÉN<sup>c</sup>, PAVEL FADRUS<sup>d</sup>, RADEK LAKOMÝ<sup>b</sup>, PAVEL SLAMPA<sup>e</sup>, ONDŘEJ SLABÝ<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>CEITEC Masaryk University, Brno, <sup>b</sup>Dept of Comprehensive Cancer Care, MMCI, Brno, <sup>c</sup>Dept of Pathology, University Hospital, Brno, <sup>d</sup>Dept of Neurosurgery, University Hospital, Brno, <sup>e</sup>Dept of Radiation Oncology, MMCI, Brno  
klerin@seznam.cz

Multiformní glioblastom (GBM) je nejčastějším nádorovým onemocněním mozku. I přes absolvování komplexní terapie skládající se z maximální možné chirurgické resekce, následné konkomitanti chemoradioterapie s temozolomidem (RT/TMZ) a adjuvantního podání TMZ se medián celkového přežívání pacientů pohybuje okolo 15 měsíců od stanovení diagnózy. Tato velmi špatná prognóza je způsobena především rezistencí GBM k léčbě, která je často spojována s přítomností glioblastomových kmenových buněk (GSC). GSC velmi často perzistují v klidové fázi buněčného cyklu a byly u nich detegovány zvýšené hladiny antiapoptotických faktorů, multdrug transportérů a DNA reparačních enzymů, což významně zvyšuje právě jejich rezistenci vůči RT/TMZ. Podobně jako u nenádorových neurálních kmenových buněk exprimují GSC markery charakteristické pro nediferencovaný buněčný stav jako je CD133. MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující jednořetězcové RNA schopné posttranskripčně regulovat genovou expresi. Tyto molekuly jsou zapojeny mimo jiné v regulaci signálních drah spojovaných s kmenovými vlastnostmi buněk a jejich změněné expresní hladiny byly pozorovány u mnoha nádorových onemocnění, včetně GBM.

V naší studii jsme analyzovali expresi 8 vybraných miRNA (let-7a, miR-128a, miR-137, miR-451, miR-138, miR-34a, miR-125b, miR-328) u CD133+ a CD133- buněk izolovaných pomocí FACS z buněčné linie A172. Stejný panel miRNA byl následně analyzován u 20 FFPE tkání primárních GBM získaných od pacientů, kteří podstoupili RT/TMZ.

MiRNA, jejichž změněná exprese bude asociována s CD133+ buňkami, mohou hrát klíčovou roli v udržování fenotypu GSC, včetně jejich rezistence k chemoradioterapii, a mohou být tedy slibnými terapeutickými cíli u GBM. Zároveň mohou být tyto miRNA vhodnými prognostickými a prediktivními biomarkery odpovědi na léčbu RT/TMZ u pacientů s GBM.

*Práce byla podpořena grantovým projektem NT13514-4/2012 MZČR, a projektem "CEITEC - Středoevropský technologický institut" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).*

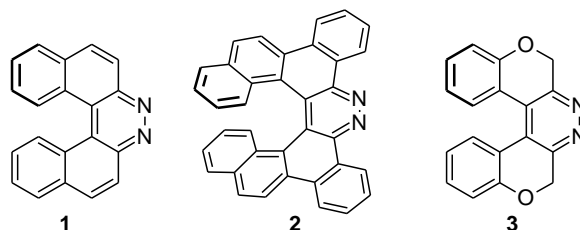
## KOCYKLOTIMERIZACE ALKYNDINITRILŮ – NOVÁ CESTA K PYRIDAZINOVÝM HELICENŮM

**JIŘÍ KLÍVAR, SERGHEI CHERCHEJA, ANDREJ JANČAŘÍK, JIŘÍ RYBÁČEK, IRENA G. STARÁ\*, IVO STARÝ\***

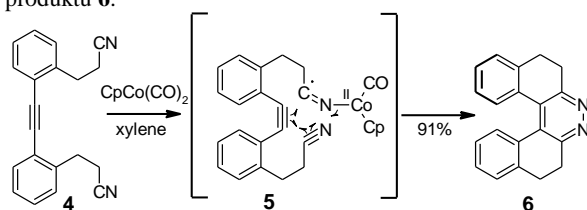
*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
klivar@uochb.cas.cz*

Použití kocyklotimerizace alkyndinitrilů za pomoci komplexu Co(I) pro tvorbu pyridazinového kruhu bylo publikováno teprve v druhé polovině 20. století. Nezávisle na práci Snydera jsme vyvinuli dvě cesty k helicenuům<sup>2,3</sup> s pyridazinovým kruhem spočívajících ve využití buď reakce v baňce anebo průtokového reaktoru. Tímto způsobem byl

připraven pyridazinový helicen **1**, dibenzohelicen **2** nebo helicenový derivát obsahující dva kyslíkové atomy **3**.



Klasický mechanismus známý pro cyklotrimerizaci<sup>4</sup> alkyndů, případně kocyklotrimerizaci nitrilu s dvěma alkyne<sup>5</sup> se zřejmě neuplatňuje z kinetických důvodů. Proto pro reakci navrhuje alternativní radikálový mechanismus, který by zahrnoval dva redox procesy na kobaltu a intermediát **5**, který vstupuje do kaskádové radikálové cyklizace za tvorby produktu **6**.



*Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (reg. č. P207/10/2207) a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (RVO: 61388963).*

## LITERATURA

- Cai C., Audet M. A. Snyder J. K.: *Heterocycles* 88, 179 (2014).
- Stará I. G., Starý, I. v knize: *Science of Synthesis* (J. S. Siegel, Y. Tobe, ed.), kap. 45b, s. 885. Thieme, Stuttgart 2010.
- Jančařík A., Rybáček J., Cocq K., Vacek Chocholoušová J., Vacek J., Pohl R., Bednářová L., Fiedler P., Císařová I., Stará I. G., Starý I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 9970 (2013).
- Saito S., Yamamoto, Y.: *Chem. Rev.* 100, 2901 (2000).
- Heller B., Hapke M.: *Chem. Soc. Rev.* 36, 1058 (2007).

## NOVÉ CHIRÁLNÍ IONEXY PRO KAPALINOVOU A SUBKRITICKOU FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIÍ

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

*<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6,  
<sup>b</sup>Katedra analytické chemie, Univerzita Víděň,  
WähringerStrasse 38, A-1090 Víděň  
michal.kohout@vscht.cz*

Systematický vývoj nových chirálních selektorů poskytl do dnešních dnů široké spektrum chirálních stacionárních fází, které umožňují rozdělit téměř libovolný

racemát. Unikátní skupinu chirálních stacionárních fází tvoří chirální ionexy. U těchto fází dochází k separaci enantiomerů v ionizovaném stavu analytu, což je výhodné při separaci vysoce polárních látek např. volných aminokyselin. Retence analytů je primárně řízena přitažlivými Coulombovskými silami mezi nabitými centry analytu a selektoru. Pro chirální rozpoznávání, a tedy vlastní enantioseparaci, jsou však nutné další podpůrné slabé interakce, jako jsou  $\pi$ - $\pi$  interakce, vodíkové vazby, van der Waalsovy či sterické interakce. Vlastní mechanismus výměny iontů se pak realizuje přidávkem vhodných protiiontů (pufrů) do mobilní fáze. Velkou výhodou ionexů je možnost snížit retenční čas analytu zvýšením koncentrace pufru zatímco selektivita zůstává zpravidla nezměněna<sup>1</sup>.

V naší práci jsme se zaměřili na vývoj nových katexů a amfolytických ionexů pro separaci biologicky aktivních aminů a volných aminokyselin<sup>2,3</sup>. Enantioselektivitu obou typů ionexů jsme studovali jak v HPLC, tak především v subFC módu. Obecně platí, že složení mobilní fáze a charakter přidané organické báze/kyseliny může významně ovlivnit chromatografické parametry separovaného analytu. Vratné reakce, k nimž dochází po přidání organického rozpouštědla (zpravidla methanol, ethanol, atd.) obsahujícím pufr či bázi do superkritického CO<sub>2</sub>, zcela mění parametry mobilní fáze. Potvrdili jsme, že metastabilní produkty vznikající *in situ* reakcí superkritického CO<sub>2</sub> a organických aditiv zaujímají v subkritické chromatografii roli pufrů a přímo se podílí na iontové výměně při separaci nabitých analytů. Prokázali jsme, že různé typy aditiv významně mění superkritické parametry systému. Postupným zvyšováním koncentrace organického aditiva jsme prokázali, že dochází k nelineární změně koncentrace produktů tvořených *in situ*<sup>2</sup>.

*Autoři děkují Peteru Fúhaufovi za pomoc při plnění analytických kolon a Dariu Borasovi za zrealizování zápujčky Acquity UPC<sup>2</sup> systému Waters.*

#### LITERATURA

1. Lämmerhofer M.: J. Chromatogr. A 814, 1217 (2010).
2. Gargano A. F. G., Kohout M., Macíková P., Lämmerhofer M., Lindner W.: Anal. Bioanal. Chem. 405, 8027 (2013).
3. Wolrab D., Frühauf P., Kohout M., Lindner W.: J. Sep. Sci. 36, 2826 (2013).
4. Wolrab D., Macíková P., Boras M., Kohout M., Lindner W.: J. Chromatogr. A 59, 1317 (2013).

#### VÝZNAM Ca-VAZEBNÉ DOMÉNY V REGULACI AKTIVITY KVASNIČNÉ NEUTRÁLNÍ TREHALASY

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

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 150 06 Praha 5, <sup>c</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4  
kopeckamirka@tiscali.cz

Neutrální trehalasa (Nth1, EC 3.2.1.28), pocházející ze *Saccharomyces cerevisiae*, hraje důležitou roli v obranné reakci kvasinek vůči stresovým situacím, jako jsou vlivy nepříznivých teplot, toxických chemikálií nebo oxidativní stres. V tomto procesu Nth1 hydrolyzuje disacharid trehalosu za vzniku dvou molekul glukosy. Aktivita enzymu Nth1 je regulována pomocí PKA-proteinové fosforylace, následnou vazbou kvasničného proteinu 14-3-3 (Bmh1) a pomocí kationtů Ca<sup>2+</sup>, které se vážou na Ca-vazebnou doménu<sup>1</sup>. Tato doména se nachází na N-konci Nth1 a obsahuje tzv. EF-hand motiv D<sup>114</sup>TDKNYQITIED<sup>125</sup>, který je konzervovaný mezi velkým množstvím Ca-vazebných proteinů.

Pro objasnění strukturální podstaty regulace aktivity Nth1 pomocí Bmh1 byla využita H/D výměna, chemické zesíťování a CD spektroskopie.

Strukturální změny, které byly odhaleny v oblastech obklopujících aktivní centrum enzymu, patrně zvyšují jeho přístupnost, což vede k aktivaci Nth1. Vazba Bmh1 ovlivňuje i strukturu Ca-vazebné domény a jejího okolí<sup>2</sup>. Byly také provedeny strukturální studie proteinů Nth1, Bmh1 a jejich komplexu metodou malouhlového rozptylu RTG paprsků (SAXS).

Pro výzkum role Ca<sup>2+</sup> v regulaci aktivity Nth1 bylo připraveno 10 jednobodových mutantů v oblasti Ca-vazebné domény Nth1 (D114L, D114E, D116L, K117L, N118L, I121L, D125L, D125E) a jejím blízkém okolí (D103L a D173L). Byla stanovena jejich aktivita v závislosti na přítomnosti Ca<sup>2+</sup>, Bmh1 nebo obou dohromady. Mutanty D114L a D125L se ukázaly jako enzymaticky neaktivní, což napovídá, že EF-hand motiv je esenciální pro aktivitu Nth1. Vazba mutantů na Bmh1 byla testována pomocí nativní TBE-PAGE a AUC. Vliv mutací na strukturu a vlastnosti Nth1 byl ověřen CD spektroskopii a diferenční skenovací fluorimetrií. Měření H/D výměny a chemického zesíťování v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> prokázala, že Nth1 zaujímá různé konformační stavy v závislosti na přítomnosti Ca<sup>2+</sup> samotných nebo společně s proteiny Bmh1 a že vykazuje rozdílnou katalytickou aktivitu.

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

#### LITERATURA

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

## STEREOSELEKTIVNÍ SYNTÉZA TETRASUBSTITUOVANÝCH ALKENŮ

**VLADISLAV KOTEK\*, TOMÁŠ TOBRMAN,  
DALIMIL DVORÁK**

Ústav organické chemie, Fakulta chemické technologie  
Vysoká škola chemicko-technologická Praha, 160 00 Praha  
kotekv@vscht.cz

Stereoselektivní syntéza dvojných vazeb prodělala v nedávné době revoluci s příchodem přechodných kovů a tradiční způsoby syntézy alkenů, založené na olefinaci karbonylových sloučenin, jsou postupně nahrazovány moderními a mnohem selektivnějšími metodikami<sup>1</sup>. Syntéza tetrasubstituovaných olefinů však nadále zůstává velice nesnadnou, zvláště při požadavku absolutní kontroly geometrie tvorby dvojných vazeb. Je proto nutno používat vysoce specifické metodiky, které jsou často poměrně nákladné, komplikované a nepříliš obecné<sup>2</sup>.

V naší laboroři jsme se zaměřili na vyvinutí zcela nové metodiky, která by neměla výše zmíněné nedostatky a přitom byla naprosto stereoselektivní. Vycházeli jsme z předpokladu, že výchozí látkou musí být obecný synthon, který jednoduchým opracováním poskytne žádané alkeny. Jeho struktura však nebyla známa. Zamýšleli jsme využití elementometalačních reakcí, experimenty však ukázaly, že tento postup je zcela nevhodný. Logickým krokem proto byla syntéza syntonů typu **I** a jejich postupná stereospecifická derivarizace. Ukázalo se, že jediným vhodným typem jsou alkenylfosfáty **II**, které lze snadno připravit z aldehydů nebo alkinů v multigramovém měřítku. Lze je snadno derivarizovat pomocí cross-coupling reakcí za tvorby tří C-C vazeb připravit tetrasubstituované alkeny (Schéma 1).

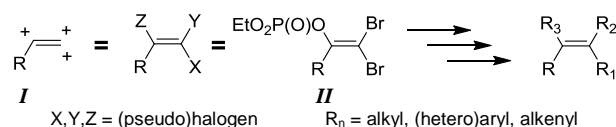


Schéma 1. Příprava a funkcionalizace alkenylfosfátů **II**

Metodika se vyznačuje vysokou obecností, tolerancí funkčních skupin a takřka naprostou stereoselektivitou. Její hlavní předností je však mimořádná jednoduchost. Úspěšně jsme ji aplikovali v syntéze několika biologicky relevantních molekul - syntetických antiestrogenů tamoxifenového typu. Detailnější diskuze výsledků bude náplní příspěvku.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2013) a podporováno grantem GA ČR (reg. č. 203/09/1552).

### LITERATURA

- Wang, C., Xu, Z., Tobrman, T., Negishi, E.: Adv. Synth. Catal. 352, 627 (2010).
- Přehled: Flynn, A., Ogilvie, W.: Chem. Rev. 107, 4698 (2007).

## VLIV NO A eATP NA VÝVOJ KOŘENOVÉHO VLÁŠENÍ U SEMENÁČKŮ GENOTYPŮ RAJČETE LIŠÍCÍCH SE REZISTENCÍ K PADLÍ RAJČATOVÉMU

**VERONIKA KRAICZOVÁ<sup>a</sup>, LUCIE KUBIENOVÁ<sup>a</sup>,  
PAVLA MORICOVÁ<sup>a</sup>, LORENZO LAMATTINA<sup>b</sup>,  
MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Katedra biochemie, PŘF Univerzita Palackého, 783 71  
Olomouc, <sup>b</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas,  
Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3250, 7600  
Mar del Plata, Argentina  
lkubienova@seznam.cz

Extracelulární adenosintrifosfát (eATP) a oxid dusnatý (NO) se poslední dobou ukazují jako významné signální molekuly ve vývoji rostlin, při klíčení pylu, růstu kořinků, životnosti buněk i buněčné smrti. Průkopníky ve studiu zapojení NO v signálních drahách eATP v rostlinných buňkách byly studie sledující produkci NO vlivem eATP v suspenzní kultuře rajčat<sup>1</sup>, u řas a v etiolovaných semenáčcích *Arabidopsis*. S-nitrosoglutathion (GSNO) představuje relativně stabilní zásobní a transportní formu NO, jejíž hladina je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). Studium aktivity a hladiny proteinu GSNOR ukazuje, že je aktivní GSNOR přítomna ve všech orgánech, ale aktivita se liší v závislosti na typu orgánu a vývojové fázi rostliny. V případě *Arabidopsis* byla za fyziologických podmínek nejvyšší exprese GSNOR popsána v kořeni a listech v rané fázi vývoje rostliny, zatímco u rajčete byla nejvyšší exprese i aktivita GSNOR detegována ve stonku a kořeni, nejnižší v listech<sup>3</sup>. Dosud není úloha GSNOR v průběhu růstu semenáčků a vývoje kořenů rostlin plně objasněna. Prezentovaná práce je zaměřena na roli GSNOR v procesu klíčení tří genotypů rajčete *Solanum* spp. lišících se rezistencí k biotrofnímu patogenu padlí rajčatové. Cílem bylo sledovat vliv aplikace eATP (stimuluje produkci NO), GSNO (donor NO), PTIO (lapač NO) a inhibitoru GSNOR (N6022) na vývoj klíčících rostlin *Solanum* spp., tj. na fyziologické parametry jako procento a rychlost klíčení, rychlost růstu a tvorba laterálních kořenů. Po aplikaci eATP a GSNO byl pozorován nárůst délky kořenů všech genotypů rajčete, v případě aplikace inhibitoru GSNOR byl intenzivnější růst pozorován v případě genotypů vykazujících rezistentní vlastnosti, naopak aplikace PTIO inhibovala růst oproti kontrolním rostlinám. Pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA byl konfokální mikroskopii zaznamenán nárůst hladiny NO v kořenových špičkách po aplikaci eATP, GSNO a inhibitoru GSNOR, naopak téměř nedetegovatelná byla produkce NO po aplikaci PTIO. Byla potvrzena významná role NO a pilotní experimenty poukázaly na roli GSNOR ve vývoji kořene.

Podpořeno granty MOBILITA Argentina 7AMB12AR027 a IGA\_PrF\_2014020.

### LITERATURA

- Foresi N. P., Laxalt A. M., Tonón C. V., Casalongue C. A., Lamattina L.: Plant Physiol. 145, 589 (2007).
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M.: Biochimie 95, 889 (2013).

## ÚLOHA NESPECIFICKÉ FOSFOLIPASY C1 V REAKCI ROSTLIN NA TEPLOTNÍ STRES

ZUZANA KRČKOVÁ<sup>a,b</sup>, JAN MARTINEC<sup>a</sup>, OLGA VALENTOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř přenosu signálů, ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, <sup>b</sup>Laboratoř rostlinné enzymologie, Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, 166 28 Praha 6  
krckovaz@vscht.cz

Nespecifická fosfolipasa C (NPC) je nedávno objevený rostlinný enzym, který katalyzuje přeměnu fosfatidylcholinu na diacylglycerol a fosfocholin. V *Arabidopsis* bylo identifikováno šest genů NPC (*NPC1-6*). Fylogenetický strom dělí NPC na dvě podrodiny, první tvoří *NPC1*, *NPC2* a *NPC6*, druhá *NPC3*, *NPC4* a *NPC5* (cit.<sup>1</sup>).

Bylo ukázáno, že nespecifické fosfolipasy C hrají roli v reakcích rostlin na nedostatek fosfátů<sup>2</sup> během toxického působení hliníku<sup>3</sup> a v reakcích na solný stres<sup>4</sup>. Signální funkce NPC byla popsána i v signalizačních kaskádách fytohormonů auxinu, brassinolidu<sup>1</sup> a kyseliny abscisové<sup>5</sup>.

V naší práci jsme studovali úlohu *NPC1* při teplotním stresu (TS). Schopnost přežít teplotní stres byla u mutantní linie *Arabidopsis* s umlčeným genem *NPC1* (*npc1*) oproti divokému typu (WT) významně snížena. Naproti tomu, linie se zvýšenou expresí *NPC1* (*NPC1-OE*) byla vůči teplotnímu stresu odolnější. Zvýšená citlivost *npc1* během TS se projevila i na sníženém obsahu chlorofylu a kratších kořenech oproti WT.

S využitím fluorescenčně značeného substrátu (bodipy – fosfatidylcholin) bylo stanoveno množství vznikajícího diacylglycerolu, odpovídající aktivitě NPC. Aktivita NPC vzrostla již po 15 min působení TS na 150 % a po 30 min na 200 %.

Dále byla zjištěna snížená exprese *NPC1* (pod 40 %) po TS. Změna exprese markerových genů teplotního stresu se nicméně u mutantních linií *npc1* a *NPC1-OE* neprojevila.

Tímto způsobem jsme jako první dokázali, že je nespecifická fosfolipasa C důležitým článkem obranného systému rostlin vůči teplotnímu stresu.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR č. P501/12/1942.

### LITERATURA

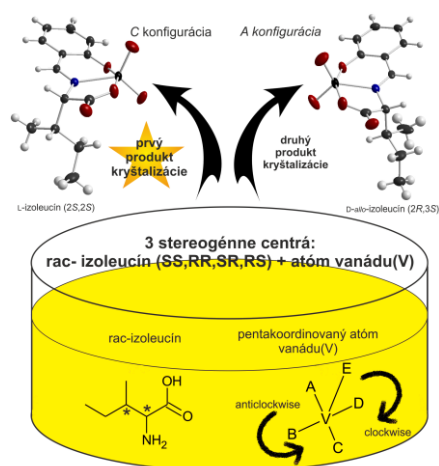
1. Wimalasekera R., Pejchar P., Holk A., Martinec J., Scherer G. F. E.: *Mol. Plant* 3, 610 (2010).
2. Gaude N., Nakamura Y., Scheible W. R., Ohta H., Dormann P.: *Plant J.* 56, 28 (2008).
3. Pejchar P., Potocký M., Novotná Z., Veselková Š., Kocourková D., Valentová O., Schwarzerová K., Martinec J.: *New Phytol.* 188, 150 (2010).
4. Kocourková D., Krčková Z., Pejchar P., Veselková Š., Valentová O., Wimalasekera R., Scherer G. F. E., Martinec J.: *J. Exp. Bot.* 62, 3753 (2011).
5. Peters C., Li M. Y., Narasimhan R., Roth M., Welti R., Wang X. M.: *Plant Cell* 22, 2642 (2010).

## IZOLÁCIA STEREOIZOMÉROV KOMPLEXU VANÁDU(V) SO SCHIFFOVOU BÁZOU Z RACEMICKEJ ZMESI

LUKÁŠ KRIVOSUDSKÝ\*, PETER SCHWENDT, JÁN ŠIMUNEK, RÓBERT GYEPES

Katedra anorganickej chemie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
krivosudskyl@fns.uniba.sk

Isolácia jedného stereoizoméru z racemickej zmesi patrí medzi najväčšie úspechy v stereochemii. Komplexy vanádu(V) sú zaujímavé najmä vďaka ich využitiu v katalýze<sup>1-3</sup>, menšia pozornosť sa venuje štúdiu ich chiralite. Kryštalizácia zo systému  $V_2O_5-NBu_4VO_3-N$ -salicyliden-rac-izoleucinát (ligand bol pripravený z *SS,RR,SR,RS*-izoleucínu) prekvapivo poskytuje výhradne jeden stereoizomér ako prvý produkt,  $NBu_4[VO_2(N$ -salicyliden-L-izoleucinát)] (1). Postupnou kryštalizáciou je možné izolovať ďalšiu frakciu,  $NBu_4[VO_2(N$ -salicyliden-D-*allo*-izoleucinát)] (2) (Obr. 1). NMR spektroskopia, polarimetrická analýza, elektrónový a vibračný cirkulárny dichroizmus potvrdili, že izolované stereoizoméry sa zhodujú v chiroptických vlastnostiach so zlúčeninami, ktoré boli pripravené z enantioméne čistých aminokyselín, L-izoleucínu a D-*allo*-izoleucínu.



Obr.1. Schematické znázornenie kryštalizácie zo systému  $V_2O_5-NBu_4VO_3-N$ -salicyliden-rac-izoleucinát

### LITERATÚRA

1. Michaelson R. C., Palermo R. E., Sharpless K. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 99, 1990 (1977).
2. Conte V., Floris B.: *Dalton Trans.* 40, 1419 (2011).
3. O'Mahony G. E., Kelly P., Lawrence S. E., Maguire A. R.: *Special Issue Reviews and Accounts ARKIVOC* (i) 1 (2011).

**PŘÍPRAVA MYRISTOYLOVANÝCH A NEMYRISTOYLOVANÝCH VIRŮM PODOBNÝCH ČÁSTIC ZE STRUKTURNÍHO POLYPROTEINU GAG MASON-PFIZEROVA OPIČÍHO VIRU**

**HANA LANGEROVÁ, TIBOR FŮZIK, RŮŽENA PÍCHALOVÁ, PAVEL ULBRICH, TOMÁŠ RUML**

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
langeroh@vscht.cz*

Retroviry patří mezi obalené RNA viry, které u svých hostitelů způsobují fatální infekce, např. AIDS a leukemie. Jedním z důležitých kroků životního cyklu retrovirů je skládání jejich částic. Proto je detailní pochopení tohoto procesu a jeho inhibice klíčovým úkolem při antiretrovirové terapii.

Všechny retroviry obsahují strukturní polyproteinový prekurzor Gag, který je sám o sobě schopen tvořit virům podobné částice (VLP) *in vitro*. Ty se svou velikostí a strukturou podobají nezralým virům. Pro strukturní a funkční studie nezralých retrovirových částic jsme se zabývali přípravou VLP složených z polyproteinu Gag Mason-Pfizerova opičího viru *in vitro*. Polyprotein Gag byl produkován v bakteriálním expresním systému a bylo zjištěno, že se v buňkách ukládá do inkluzních tělísek. Z toho důvodu bylo nutné optimalizovat jeho purifikaci za denaturujících podmínek tak, abychom obdrželi plně funkční protein schopný tvořit VLP.

Tvorba částic a jejich morfologie byly analyzovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie a ultracentrifugace v iodixanolovém gradientu. Jelikož bylo zjištěno, že myristoylace N-terminální domény Gag, tedy matrixového proteinu, má důležitou roli při životním cyklu M-PMV, připravili jsme i takto modifikovaný protein a opět jsme studovali jeho schopnost tvořit VLP.

Naše práce byla dále zaměřena na studium interakcí VLP připravených z myristoylovaného i nemyristoylovaného polyproteinu Gag s důležitou komponentou plazmatické membrány – s fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem - pomocí metody rezonanční excitace povrchových plazmonů (surface plasmon resonance, SPR).

**LITERATURA**

1. Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., de Wilde M.: *Cell* 59, 103 (1998).
2. Klikova M., Rhee S.S., Hunter E., Ruml T.: *J. Virol.* 69, 1093 (1995).

**STUDIUM ROLE FOSFOFRUKTOKINASY A A B V METABOLISMU *Mycobacterium tuberculosis***

**IVA MACHOVÁ, JAN SNÁŠEL, IVA PICOVÁ**

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

Tuberkulóza (TB) je i v 21. století jednou z nejčastějších smrtelných nemocí způsobenou bakteriemi. Původce tuberkulózy, *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), je patogen, který je schopen se přizpůsobit měnícím se podmínkám v hostitelském organismu v průběhu infekce, popř. utlumit svůj metabolismus na minimum, a tedy přežívat v hostiteli v tzv. latentní formě bez symptomů onemocnění. Touto latentní formou infekce je postižena až třetina světové populace, u které hrozí aktivace akutní formy TB.

V průběhu adaptace bakterie na hostitelské prostředí dochází k významným změnám v centrálním metabolismu a ke zvýšení exprese některých klíčových metabolických enzymů. Jedním z těchto enzymů je fosfofruktokinasa (Pfk), která je zapojena v glykolýze. V MTb genomu jsou přítomny dva geny nazvané *PFK A* a *PFK B*. Během latence dochází k výraznému zvýšení exprese *PFK B* a ke snížení hladiny *PFK A*. Cílem naší práce je pokusit se zjistit, proč právě Pfk B hraje významnou roli v latenci, a které specifické vlastnosti tohoto enzymu jsou výhodné pro latentní formu MTb. Proto jsme provedli podrobnou charakterizaci Pfk A a Pfk B. Zaměřili jsme se především na substrátovou specifitu, která může souviset s jejich odlišnou rolí v alternativních biochemických dráhách a na vliv rozličných metabolických produktů a přirozených inhibitorů na katalytickou aktivitu Pfk A a Pfk B.

Pfk A i B jsou ATP dependentní enzymy, které jsou schopné s různou účinností využívat i GTP či ITP jako donor fosfátové skupiny. Oba enzymy se odlišují i svou afinitou k přirozenému sacharidovému substrátu, fruktose-6-fosfátu a potřebují ke své činnosti přítomnost specifických kationtů. Pfk A, na rozdíl od Pfk B, je schopná katalyzovat také zpětnou reakci ve směru glukoneogeneze.

*Tato práce vznikla za podpory SystemeTb Collaborative Project (245187), financovaného ze Sedmého rámcového programu Evropské komise.*

## PŘÍPRAVA KONTROLNÍCH ARMORED RNA VIRUS-LIKE ČÁSTIC A JEJICH VYUŽITÍ V DETEKCI RNA VIRŮ

**PAVEL MIKEL<sup>a,b,\*</sup>, PETRA VAŠIČKOVÁ<sup>a</sup>, RADEK TESÁŘÍK<sup>a</sup>, PAVEL KULICH<sup>a</sup>, HANA MALENOVSKÁ<sup>a</sup>, PETR KRÁLÍK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i, Hudcova 296/70, 621 00, Brno; <sup>b</sup>Ústav experimentální biologie, PřF MU, 611 37 Brno  
mikel@vri.cz

RNA viry jsou původci mnoha závažných infekčních onemocnění postihujících lidi a zvířata, např. chřipka, hepatitida (HAV, HCV, HEV), slintavka a kulhavka, klíšťová encefalitida atd. K detekci a kvantifikaci RNA virů se využívá reverzně transkripční real-time PCR (qRT-PCR). Analýza RNA virů je ve srovnání s analýzou DNA virů náročnější a komplikovanější metodou a to především kvůli kroku reverzní transkripce před samotnou PCR. Překážku rutinní analýze RNA virů pomocí qRT-PCR představuje zejména nedostatek spolehlivých RNA pozitivních standardů, které by umožnily kontrolu všech kroků analýzy virové RNA. Cílem této studie proto byla příprava armored RNA virus-like (aRNA) částic s využitím balicího systému bakteriofága MS2<sup>1,2</sup>. Částice aRNA obsahují definovanou kontrolní RNA zabalenou do fágových hlaviček, které ji chrání před degradací RNázami.

Částice aRNA byly připraveny s využitím bioinformatické analýzy sekvencí, klonování a sekvenování specifických restričních fragmentů a PCR amplikonů, western blot analýzy, ultrasonifikace a elektronové mikroskopie.

S využitím výše zmíněných metod byly připraveny aRNA částice nesoucí námi navrženou, specifickou sekvenci kontrolní RNA. Byla ověřena jejich schopnost odolávat působení RNáz. Připravené aRNA částice byly úspěšně využity jako kontrolní částice v qRT-PCR pro detekci a kvantifikaci RNA virů. Tyto částice nejsou infekční a nemají schopnost se replikovat a kontaminovat tak laboratorní prostředí. Ve srovnání s čistou RNA je stabilita aRNA částic mnohem vyšší a mohou tak být uchovávány v různých podmínkách po dlouhou dobu bez rizika degradace. aRNA částice také napodobují analyzované RNA viry, čímž dále zvyšují specifitu analýzy.

*Tato práce vznikla za podpory grantů NT13884-4/2012 a AdmireVet CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01.*

### LITERATURA

1. Pickett G. G., Peabody D. S.: Nucl. Acids Res. 21, 4621 (1993).
2. Pasloske B. L., Walkerpeach C. R., Obermoeller R. D., Winkler M., DuBois D. B.: J. Clin. Microbiol. 36, 3590 (1998).

## PEPTID CART (COCAINE- AND AMPHETAMINE-REGULATED TRANSCRIPT) V SIGNALIZACI BUNĚK PC12

**VERONIKA NAGELOVÁ, BLANKA ŽELEZNÁ, LENKA MALETÍNSKÁ**

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

Peptid CART (cocaine- and amphetamine- regulated transcript) je neuropeptid, který snižuje příjem potravy (anorexigenní peptid) a nachází se především v hypothalamu. Přesto, že peptid CART je znám více než 15 let, stále ještě nebyl nalezen jeho receptor. Peptid CART je schopen se specificky vázat na tumorovou feochromocytomovou buněčnou linii PC12<sup>1</sup>. U buněk PC12 diferencovaných v neurální fenotyp pomocí NGF (nerve growth factor) se trojnásobně zvýšil počet vazebných míst pro peptid CART oproti nediferencovaným buňkám. Buňky PC12 diferencované dexametasonem na chromafinní buňky vykazovaly vysokou nespecifickou vazbu a tím nestanovitelný, velmi nízký počet vazebných míst. Sám peptid CART neměl vliv na proliferaci, ani na diferenciaci buněk PC12. Lze tedy předpokládat, že receptor(y) pro peptid CART se kromě neuronů nacházejí spíše v tumorových než normálních buňkách dřeně nadledvin.

Při zkoumání buněčné signalizace u buněk PC12 bylo zjištěno, že peptid CART zvyšuje fosforylaci SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun-amino-terminal kinase) a následně i aktivaci c-Jun. Tento efekt byl zastaven SP600125, specifickým inhibitorem dráhy JNK. Peptid CART významně neovlivňoval fosforylaci ERK (extracellular signal-regulated kinase), CREB (cAMP responsive element binding protein) a p38, ani aktivaci c-Fos<sup>2</sup>.

Aktivace c-Jun naznačuje možnou roli peptidu CART ve zvládnutí stresových podmínek, spíše než v působení na proliferaci a diferenciaci buněk. Tento fakt by mohl naznačovat další cestu zkoumání.

*Tato práce byla podpořena záměrem ústavu ÚOCHB AVČR RVO:61388963 a grantem GAČR P303/10/1368.*

### LITERATURA

1. Maletínská L., Maixnerová J., Matyšková R., Haugvicová R., Šloncová E., Elbert T., Slaninová J., Železná B.: Eur. J. Pharmacol. 559, 109 (2007).
2. Nagelová V., Pirmík Z., Železná B., Maletínská L.: Brain Res. 2014; v tisku.

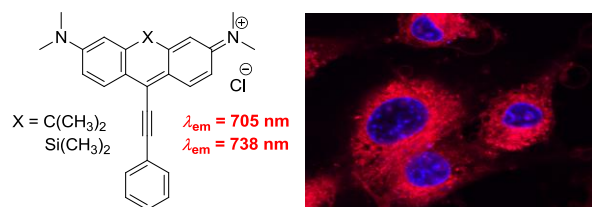
## NOVÁ TRIEDA FLUORESCENČNÝCH FARBÍV ZALOŽENÝCH NA PYRONÍNOVOM SKELETE URČENÝCH PRE BIOIMAGING

**TOMÁŠ PASTIERIK<sup>a</sup>, PETER ŠEBEJ<sup>a</sup>, JIŘINA MEDALOVÁ<sup>b</sup>, PETER ŠTACKO<sup>a</sup>, PETR KLÁN<sup>\*a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav chemie a RECETOX, PŘF MU, 625 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav experimentální biologie PŘF, MU, 613 77 Brno  
pastierik@mail.muni.cz, \*klan@sci.muni.cz

Fluorofory rhodaminového a pyronínového typu sú s obľubou využívané v biológii a medicíne. Vďaka ich výhodným fotofyzikálnym vlastnostiam si našli uplatnenie ako fluorescenčné značky alebo biosenzory<sup>1-3</sup>.

Navrhli sme a pripravili nové 9-fenylethynyl analógy pyronínov (obr.1). Oba deriváty, C-pyronín (C-pyr) a Si-pyronín (Si-pyr), majú dva absorpčné pásy, ktoré v metanole a PBS (phosphate buffer saline) poskytujú silnú fluorescenciu v blízkej IČ oblasti spektra ( $\lambda_{em} = 705$  nm (C-pyr) a 738 nm (Si-pyr)) s vysokým kvantovým výťažkom fluorescencie ( $\Phi_f = 0.15$  (C-pyr) a 0.07 (Si-pyr)).



Obr. 1. Na ľavej strane: štruktúra 9-fenylethynylových farbív. Na pravej strane: modrá fluorescencia (DAPI – lokalizovaná v bunkových jadrách), červená fluorescencia (Si-/C-pyronín lokalizovaný v mitochondriách)

Nami pripravené deriváty majú sľubné využitie pre meranie mitochondriálneho membránového potenciálu (MMT) alebo detekciu ROS (reactive oxygen species) kvôli ich vysokej selektivitě voči mitochondriám v myelómových bunkách *in vivo*. Navyše, veľký pseudo-Stokesov posun zabraňuje samozhášaniu a dva absorpčné pásy dovoľujú výber vlnovej dĺžky excitačného žiarenia a tým poskytujú určitú slobodu pri návrhu bioimaging experimentov.

Táto práca vznikla za podpory grantov poskytnutých GA ČR (13-25775S) a Recetox (projekty CETOCOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001, CZ.1.07/2.3.00/30.0037).

### LITERATÚRA

1. Ueno T., Nagano T.: Nat. Methods 8, 642-645 (2011).
2. Ward M. W.: Quantitative Analysis of Membrane Potentials, in Live Cell Imaging, Methods and Protocols (Papkovsky, D. B. ed.) Springer New York, 591, 335 (2010).
3. Kolmakov K., Belov V. N., Bierwagen J., Ringemann C., Mueller V., Eggeling C., Hell S. W.: Chem. Eur. J. 16, 158 (2010).

## STRUKTURA A FUNKCE ONKOGENNÍ WIP1 FOSFATASY

**SOŇA PECHÁČKOVÁ<sup>a</sup>, J. PÍSAČKOVÁ<sup>b</sup>, P. ŘEZÁČOVÁ<sup>b</sup>, L. MACŮREK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Department of Cancer Cell Biology, Institute of Molecular Genetics, ASCR, Prague, <sup>b</sup>Department of Structural biology, Institute of Molecular Genetics, ASCR, Prague  
sona.pechackova@img.cas.cz

Poškodení DNA aktivuje evolučně konzervovanou signální dráhu DDR (DNA damage response), která rozpoznává poškození DNA, dočasně zabraňuje progresi buněčným cyklem (checkpoint) a následně umožňuje aktivaci reparačních mechanismů pro opravu DNA. V souvislosti s organismem reprezentuje DDR dráha ochrannou bariéru před rozvojem nádorového bujení<sup>1</sup>.

Wip1 (wild-type p53-inducible phosphatase 1; *PPM1D*) patří do rodiny PP2C serin/threonin protein fosfatas a po poškození DNA je zodpovědná za negativní regulaci DDR dráhy prostřednictvím defosforylace klíčových proteinů této signalizace (p53, ATM, Chk1/2, γH2AX, p38). Po úplné opravě poškozené DNA vede exprese Wip1 fosfatas k tlumení odezvy DDR signalizace a umožňuje návrat k buněčné proliferaci. Naproti tomu amplifikace lokusu nesoucího gen pro Wip1 byla pozorovaná u řady lidských nádorů. V porovnání s ostatními fosfatasami z rodiny PP2C je Wip1 Mg<sup>2+</sup>-dependentní a katalytická doména obsahuje dvě unikátní oblasti (Pro-loop a B-loop), které jsou nezbytné pro katalytickou aktivitu. Dosavadní znalosti o struktuře Wip1 můžeme čerpat pouze na základě homologního 3D modelování z nedávných prací<sup>2,3</sup>.

Hlavním cílem našeho projektu je stanovit trojrozměrnou strukturu Wip1 fosfatasu a tím přispět k porozumění molekulárních mechanismů regulace aktivity Wip1. Určení struktury Wip1 fosfatasu také umožní vývoj selektivních inhibitorů tohoto onkogenního proteinu.

Za tímto účelem jsme připravili panel vektorů pro expresi zkrácených variant katalytické domény Wip1 s kotvou pro afinitní chromatografii. Optimalizovaná exprese rekombinantních proteinů byla následovaná IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography) metodou jako první purifikační krok. K identifikaci optimálních podmínek pro stabilitu a rozpustnost zkoumaného proteinu byla použita fluorescenční esej DSL (differential scanning fluorimetry). K určení struktury Wip1 fosfatasu použijeme metodu rentgenové krystalografie. V současné době jsme přistoupili k HTP testování krystalizačních podmínek pomocí komerčních souprav o různém složení (pH, anion/kation, precipitační činidlo, koncentrace proteinu, teplota).

Enzymatická aktivita rekombinantních proteinů byla ověřena pomocí *in vitro* fosfatasové esej. Kinetiku enzymatické reakce měříme v přítomnosti syntetického fosfo-peptidu odvozeného od endogenního substrátu p53 (Ser15). K hledání selektivního inhibitoru Wip1 fosfatasu využíváme fluorescenční HTP esej, kterou aplikujeme k testování dostupné knihovny chemických sloučenin (až 30000).



Tato práce vznikla za podpory GA ČR P305-12-2485.

## LITERATURA

1. Kleiblová P., Shaltiel I.A., Benada J., Ševčík J., Pecháčková S., Pohlreich P., Voest E.E., Dundr P., Bartek J., Kleibl Z., Medena R.H., Macůrek L.: *J. Cell. Biol.* 201, 511 (2013).
2. Chuman Y., Yagi H., Fukuda T., Nomura T., Matsukizono M., Shimohigashi Y., Sakaguchi K.: *Protein Pept. Lett.* 15, 938 (2008).
3. Gilmartin G. A. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.* 10, 181 (2014).

### KLONÁLNÍ EVOLUCE A VÝZNAM IMUNOGLOBULINOVÝCH GENŮ U CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE

**KARLA PLEVOVÁ, HANA SKUHROVÁ FRANCOVÁ,  
ŠÁRKA PAVLOVÁ, JITKA MALČÍKOVÁ, YVONA  
BRYCHTOVÁ, MICHAEL DOUBEK, BORIS TICHÝ,  
ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ**

*Fakultní nemocnice Brno & CEITEC, Masarykova  
univerzita, Černopolní 9, 613 00 Brno  
karla.plevova@fnbrno.cz*

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je hematologické onemocnění s velmi různorodým průběhem. Mezi nejvýznamnější znaky leukemických B lymfocytů, které vypovídají o prognóze CLL, patří mutační status imunoglobulinových genů (IG) a přítomnost určitých chromozomálních aberací. Jejich biologická povaha ovlivňuje schopnost nádorové populace interagovat s prostředím, růst a odolávat protinádorové léčbě.

V souboru 1143 pacientů s CLL jsme vybrali molekulární markery vyšetřovali dlouhodobě a opakovaně. Sledovali jsme, které vlastnosti imunoglobulinových receptorů a které chromozomální aberace jsou v průběhu nemoci upřednostňovány a mají potenciálně význam v patogenезi onemocnění.

Nalezli jsme 31 pacientů (2,7 %) s vícečetnými přestavbami IG, které mohou naznačovat přítomnost více nádorových klonů. Pomocí průtokové cytometrie a podrobných molekulárních analýz IG jsme identifikovali nejméně dva nezávislé leukemické klonu u 25/31 pacientů. U opakovaně vyšetřených pacientů jsme pozorovali expanzi klonů s určitými vlastnostmi IG na úkor jiných. Potvrdili jsme, že klonu nesoucí nemutované IG získaly selekční výhodu, zatímco klonu s mutovaným IG postupně vymizely. Obdobně byla u expandujících klonů častěji zjištěna delší imunoglobulinová oblast HCDR3. Obě vlastnosti – nemutované IG a delší HCDR3, přítomné v 71 % upřednostněných klonů ( $p=0,005$ ) – se vyskytují především u pacientů s nepříznivou prognózou<sup>1</sup>. Mají vliv na charakter B-buněčného receptoru, který zprostředkovává aktivaci B lymfocytu. Selekcí maligního klonu je také ovlivněna přítomnost chromozomálních aberací. Výrazný vliv má přítomnost mutací v genu *TP53*.

Popsali jsme vlastnosti B-buněčného receptoru, které pravděpodobně hrají významnou úlohu při evoluci CLL. Vliv na selekci nádorového klonu měly také přítomné chromozomální abnormality.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR NT13493/2012-4.

## LITERATURA

1. Plevová K., Skuhrova Francova H., Burckova K., Brychtova Y., Doubek M., Pavlova S., Malcikova J., Mayer J., Tichy B., Pospisilova S.: *Haematologica* 99, 329 (2014).

### SYNTÉZA A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI NOVÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ S „DE VRIESOVÝM“ FÁZOVÝM PŘECHODEM

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

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

Termotropní kapalně krystalické látky se liší od jiných typů látek schopností tvořit mezofáze při přechodu mezi kapalným a pevným stavem. Těto unikátní vlastnosti se široce využívá v termografii, při konstrukci LCD a v drug-delivery systémech. Některé chirální kapalně krystalické látky jsou schopny tvořit z praktického hlediska velmi významnou sekvenci chirální smectické A (SmA\*) a chirální smectické C (SmC\*) fázi využívanou pro konstrukce velmi rychlých LCD s vysokým kontrastem<sup>1</sup>. Avšak při fázovém přechodu mezi SmA\*-SmC\* dochází většinou ke smrštění (snížení tloušťky) vrstev a výskytu tzv. “zig-zag” defektu, což drasticky snižuje výkon displejů<sup>2</sup>. Řešením tohoto problému jsou materiály s “de Vriesovým” chováním (nulovým smrštěním).

V této práci jsme se zaměřili na optimalizaci struktury látky **I**, která vykazuje malé smrštění smectické vrstvy (~ 3 %)<sup>3</sup>, a to syntézou řady látek se záměnou fenylového jádra v centrální jednotce za thiofenové, zavedením fotosenzitivní azoskupiny a zavedením laterálního substituentu do aromatického systému (Schéma 1).

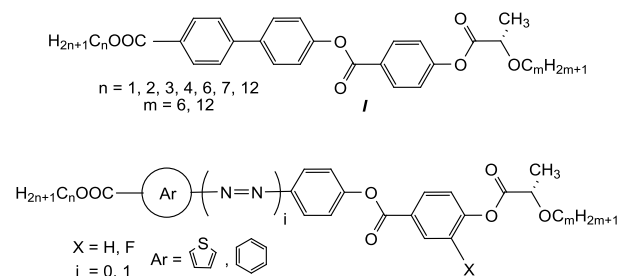


Schéma 1. Strukturální vzorce materiálů

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 13-07397P.

#### LITERATURA

1. Clark N. A., Lagerwall S. T.: Appl. Phys. Lett. 899, 36 (1980).
2. Rieker T. P., Clark N. A., Smith G. S., Parmar D. S., Sirota E. B., Safinya C. R.: Phys. Rev. Lett. 59, 2658 (1987).
3. Kohout M., Bubnov A., Novotná V., Svoboda J., v knize: 14<sup>th</sup> International conference on ferroelectric liquid crystals abstract book, poster č. 31 (2013).

#### SYNTEZA LIGNANŮ A JEJICH DERIVÁTŮ

**JIŘÍ POSPÍŠIL\***, **JIŘÍ GRŮZ**, **HANA KOZUBÍKOVÁ**,  
**DANIELA KONRÁDOVÁ**

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého  
a ÚEB AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 41 Olomouc  
j.pospisil@upol.cz

Lignany, sekundární metabolity vyšších rostlin, se vyznačují velkou strukturální rozmanitostí a je proto až s podivem, že jejich základní skelet se skládá „pouze“ ze dvou fenylypropanových ( $C_6C_3$ ) podjednotek spojených atomy uhlíku C8-C8' (Schéma 1)<sup>1</sup>. Díky této strukturální různorodosti se lignany vyznačují různorodou biologickou aktivitou (např. antivirální, antioxidantivní, antimikrobiální, imunosupresivní *etc.*)<sup>2,3</sup>.

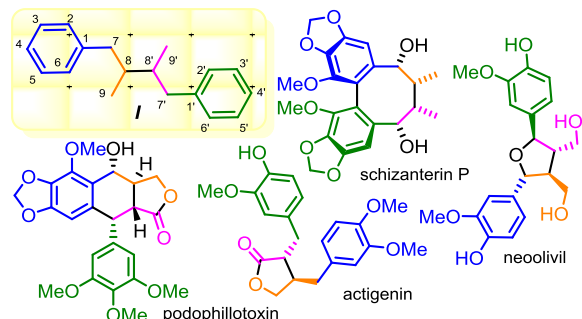


Schéma 1. Základní skelet lignanů (I) a přírodní látky z něj odvozené

V rámci našeho projektu jsme navrhli a zobecnili flexibilní syntetický přístup k virtuálně všem strukturálním typům lignanů. Tento postup je založen na využití jediného „mateřského“ skeletu (II), který pak slouží jako základní stavební blok při syntéze přírodních lignanů i jejich derivátů (Schéma 2).

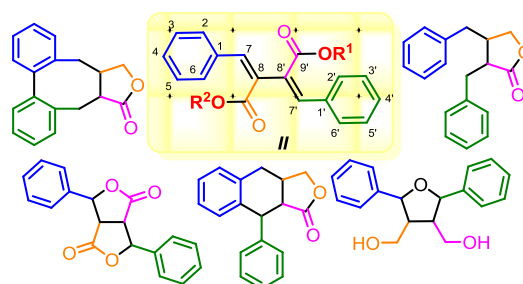


Schéma 2. 'Mateřský' základní stavební blok (II) při syntéze lignanů

Práce vznikla za podpory grantu GAČR 503/12/P166.

#### LITERATURA

1. Umezawa T.: Phytochem. Rev. 2, 371 (2003).
2. Cunha W. R., Andrade M. L., Veneziani R. C. S., Ambrósio S. R., Bastos J. K. v knize: *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, kap. 10, s. 213. InTech, Šanghaj 2012.
3. Apers S., Vlietinck A., Pieters L.: Phytochem. Rev. 2, 201 (2003).

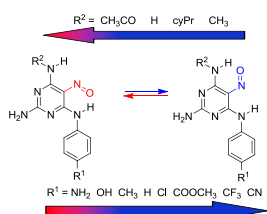
#### VLIV SUBSTITUENTŮ NA INTRAMOLEKULÁRNÍ VODÍKOVÉ VAZBY U POLYSUBSTITUOVANÝCH 5-NITROSOPYRIMIDINŮ

**ELIŠKA PROCHÁZKOVÁ**, **LUCIE ČECHOVÁ**,  
**ZLATKO JANEBA**, **MARTIN DRAČÍNSKÝ**

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

Vznik intramolekulární vodíkové vazby má velký vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti celé molekuly. Například se látka může stát více lipofilní a tím snáze prostupovat přes buněčné membrány, navíc se změní její spektrální vlastnosti. Velmi silné intramolekulární vodíkové vazby se často vyskytují v případech, kdy může vzniknout šestičlenný cyklus, který obsahuje mimo jiné  $sp^2$ -hybridizované atomy, což je možné pozorovat u polysubstituovaných 5-nitrosopyrimidinů. Nitrosopyrimidiny se přirozeně nevyskytují, ale u modifikovaných nitrosopyrimidinů byly prokázány cytostatické účinky. Kromě toho se tyto látky používají jako prekurzory pro syntézu celé řady biologicky aktivních látek, jako jsou triazoly, pteridiny a puriny.

V této práci byla připravena série 32 polysubstituovaných 2-amino-5-nitrosopyrimidinů, u kterých nitroso skupina tvoří silnou intramolekulární vodíkovou vazbu se sousedními NH skupinami (alkylamino, arylamino)<sup>1</sup>. V roztoku se ustavuje rovnováha mezi dvěma rotamery, které se vzájemně liší orientací nitroso skupiny, viz obr. 1.



Obř. 1. Struktura obou rotamerů studovaných látek

Směs obou rotamerů lze pozorovat pomocí NMR spektroskopie jako dvě sady signálů v  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektrech. Rovnovážné složení této směsi je silně závislé na zvolených substituentech. Byla nalezena korelace mezi rovnovážným poměrem rotamerů a Hammettovými konstantami *para*-substituentů. UV/Vis spektra studovaných látek významně závisí na vybraných substituentech, ale nezávisí na orientaci nitroso skupiny. U těchto látek byl pozorován také solvatochromní efekt. Experimentální data byla podpořena DFT výpočty.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 13-24880S a grantu Ministerstva vnitra ČR VG20102015046 jako výzkumný projekt ÚOCHB AV ČR RVO61388963.

#### LITERATURA

1. Procházková E., Čechová L., Janeba Z., Dračinský M.: J. Org. Chem. 78, 10121 (2013).

### SELEKCE A CHARAKTERIZACE ANTICALINŮ VÁZAJÍCÍCH LIDSKOU GLUTAMÁTKARBOXYPEPTIDASU II

JAKUB PTÁČEK<sup>a,b</sup>, ANTONIA RICHTER<sup>c</sup>, ARNE SKERRA<sup>c</sup>, CYRIL BAŘINKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biotechnologický ústav AV ČR, Praha, <sup>b</sup>Univerzita Karlova, Praha, <sup>c</sup>Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, München  
ptacekj@img.cas.cz

Glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII) je transmembránový glykoprotein a jeho vysoká exprese v nádorových buňkách prostaty a v neovaskulatuře většiny pevných nádorů z něj dělá velmi vhodný cíl pro zobrazovací a terapeutické klinické aplikace. Současné přístupy k terapii a zobrazovacím technikám cíleným na GCPII využívají jak malé organické molekuly (inhibitory GCPII), tak protilátky. Anticaliny představují alternativu, která má proti zmíněným přístupům řadu výhod.

Anticaliny jsou součástí nové rodiny proteinů inženýrovaných pro specifické vazebné funkce. Jejich vlastnosti (malá velikost, exprese v *E.coli*, dobrá penetrace tkáněmi, stabilita, modifikovatelný plazmatický poločas) z nich dělají přímého konkurenta protilátkám ve všech případech, kde jsou jejich vlastnosti výhodné. Vazebné místo Anticalinů je tvořeno čtyřmi flexibilními smyčkami spojujícími 8 antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů tvořících rigidní  $\beta$ -barel. Tyto smyčky jsou obdobou CDR (complementarity-determining region) protilátek a v kombi-

natoriální knihovně, která byla použita pro selekci Anticalinů, jsou aminokyseliny smyček plně randomizované. Selekcce Anticalinů specificky rozpoznávajících GCPII byla provedena pomocí fágového dipleje – techniky využívající propojení fenotypu (Anticalin) a genotypu (fágová DNA obsahující gen kódující Anticalin) prostřednictvím M13 bakteriofágů. Jako cíl byla použita biotinylovaná extracelulární část GCPII imobilizovaná na paramagnetické kuličky pokryté Streptavidinem. Izolované klony vykazovaly vůči GCPII afinitu 10 – 50 nM (stanovena pomocí ELISA) a technikou afinitní maturace, kdy jsou prostřednictvím error-prone PCR zavedeny náhodné mutace, jsme dokázali afinitu u nejlepšího klonu zvýšit až 1 nM. Následná FACS (fluorescence activated cell sorting) analýza na buněčných liniích prokázala schopnost selektovaných Anticalinů specificky značit živé buňky exprimující GCPII a tato data byla rovněž potvrzena imunofluorescenční konfokální mikroskopií.

Získané Anticaliny budou dále vylepšovány pomocí afinitní maturace, racionálního designu a směřovány ke zvířecím experimentálním modelům pro ověření jejich schopnosti selektivně rozpoznávat nádorové buňky *in vivo*.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (GAP301/12/1513) a GAUK (510112).

### HETEROLOGNÍ EXPRESE A CHARAKTERIZACE NOVÉHO ANTIMIKROBIÁLNÍHO PEPTIDU *Z Phaseolus lunatus*

KLÁRA RICHTEROVÁ, MARTINA NOVÁKOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6  
klara.richterova@vscht.cz

Produkce a izolace proteinů a peptidů, využitelných např. v humánní medicíně, přímo z přirozených zdrojů může být velmi problematická a neefektivní. Rekombinantní exprese v mikrobiálních systémech je metoda, která je v biotechnologiích využívána pro produkci většího množství dané látky za instrumentálně, časově a finančně méně náročných podmínek. Ačkoliv se na látky připravené tímto způsobem a na jejich využití v humánní medicíně nahlíží často skepticky, s rostoucími poznatky základního výzkumu a se stále zdokonalující se metodikou jsou už dnes evidovány v různých fázích klinického výzkumu<sup>1</sup>. Produkované antimikrobiální látky však mohou mít širší využití, a to v podobě fungicidních postřiků.

Tato práce se zabývá rekombinantní produkcí antimikrobiálního peptidu z fazolu (*Phaseolus lunatus*), čeledi *Fabaceae*. Z literatury<sup>2</sup> byla převzata aminokyselinová sekvence nepojmenovaného peptidu, který vykazuje antifungální účinky proti rostlinným patogenům *Fusarium oxysporum*, *Phylospora piricola*, *Mycosphaerella arachidicola* a také schopnost inhibovat reverzní transkriptasu viru HIV<sup>3,4</sup>. Přesná nukleotidová sekvence genu kódujícího tento peptid nebyla známa, v rámci této práce však byla úspěšně zjištěna. Přeložením nukleotidové

sekvence byly zjištěny rozdíly v 5 aminokyselinách oproti původně publikované sekvenci. Strukturální motiv, typický pro tuto skupinu peptidů, byl ale zachován. Nově získaný peptid byl nazván PHALUNA (akronym z vědeckého názvu zdrojového organismu *Phaseolus lunatus*) a gen kódující tento peptid *PIDef1*.

Gen *PIDef1* byl následně vnesen do kvasničného vektoru a ten do *Pichia pastoris* SMD1168H. V současné době jsou optimalizovány podmínky exprese, izolace a purifikace daného peptidu z kvasinek. Projekt se rovněž zabývá přípravou vektorů s genem *PIDef1* pro expresi v bakteriálním i kvasničném systému metodou homologní rekombinace. Pro vyšší úspěšnost exprese v kvasničném systému byl získán syntetický analog genu *PIDef1*, pojmenovaný *PIDef1\_S*, s kodónovým složením optimalizovaným pro expresi v *Pichia pastoris*. U obou variant genu *PIDef1* bude studována míra exprese v jednotlivých systémech.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2013).

#### LITERATURA

1. Steinstraesser L. et al.: Immunobiology 216, 3 (2011).
2. Wang H. X., Ng T. B.: Appl. Microbiol. Biot. 73, (2006).
3. Wong J. H., Ng T. B.: Peptides 26, 2086 (2005).
4. Games P., dos Santos I. S., Mello É. O., Diz M. S. S., Carvalho A. O., de Souza-Filho G. A., Da Cunha M., Vasconcelos I. M., dos S. Ferreira B., Gomes V. M.: Peptides 29, 2090 (2008).

#### SFÉRIKÉ MONODISPERZNÍ NANODIAMANTY – BIOLOGICKY INERTNÍ SONDY PRO FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ

**IVAN ŘEHOŘ, JITKA ŠLEGEROVÁ, JAN HAVLÍK, PETR ČÍGLER\***

Laboratoř syntetické nanochemie, ÚOCHB AV ČR,  
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
cigler@uochb.cas.cz, www.petr cigler.cz

Fluorescenční nanodiamanty (FND) jsou extrémně slibnými luminiscenčními sondami a senzory v biomedicinském výzkumu. Nabízejí unikátní vlastnosti, jako jsou absolutní fotostabilita a vysoká biokompatibilita. Tento příspěvek pojednává o způsobu přípravy FND, přímo aplikovatelných v biomedicině.

FND s nejvyššími hodnotami fluorescence se připravují z nanodiamantů syntetizovaných za podmínek vysoké teploty a tlaku (High pressure high temperature – HPHT)<sup>1</sup>. HPHT ND jsou polydisperzní a nepravidelného tvaru. Byla vyvinuta unikátní metoda, která polydisperzní komerční HPHT ND oleptává na vrcholech a hranách a poskytuje pseudosférické ND. Z těchto diamantů byla opakovanou centrifugací izolována frakce monodisperzních pseudosférických ND o velikosti 40 nm. *In vitro* buněčné studie odhalily odlišné chování sférických a hranatých ND, například sférické ND nezvyšují míru apoptózy.

Stejně jako všechny anorganické koloidní částice i ND aglomerují v prostředích s vyšší iontovou silou, což znemožňuje jejich přímou biologickou aplikaci. FND byly obaleny biokompatibilní polymerní slupkou, která je chrání před agregací v prostředích s extrémní iontovou silou (1 M NaCl). Polymer dále chrání částice před nežádoucí sorpcí proteinů krevního sera. Polymerní řetězce mohou být snadno dále modifikovány pomocí Huisgenovy cykloadice („click reakce“)<sup>2,3</sup>.

Komplexní opracovávání a modifikace FND na různých úrovních umožnilo připravit vysoce fluorescenční přímo bioaplikovatelný materiál sestávající z monodisperzních pseudosférických FND pokrytých biokompatibilním polymerem, který umožňuje další chemické modifikace (bio)molekulami.

Práce vznikla za podpory grantů GA ČR č. P108/12/0640 a MŠMT ČR č. LH11027.

#### REFERENCES:

1. Havlik J., Petrakova V., Rehor I., Petrak V., Gulka M., Stursa J., Kucka J., Ralis J., Rendler T., Lee S.-Y., Reuter R., Wrachtrup J., Ledvina M., Nesladek M., Cigler P.: Nanoscale 5, 3208 (2013).
2. Rehor I., Mackova H., Filippov S. K., Kucka J., Proks V., Slegerova J., Hyvl J., Turner S., Van Tendeloo G., Ledvina M., Hruby M., Cigler P.: ChemPlusChem 79, 21 (2014), DOI: 10.1002/cplu.201300339.
3. Rehor I., Slegerova J., Kucka J., Proks V., Petrakova V., Adam M.-P., Treussart F., Turner S., Bals S., Sacha P., Ledvina M., Wen A. M., Steinmetz N. F., Cigler P.: Small 10, 1106 (2014), DOI: 10.1002/sml.201302336.

#### VYUŽITÍ TRANSMETALACE ALKYL ARYL SULFONŮ V TOTÁLNÍ SYNTÉZE CYKLOPENTANOIDNÍCH MONOTERPENŮ

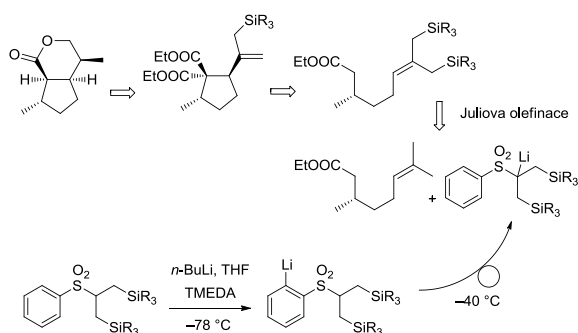
**LUCIE ŘEHOVÁ, ULLRICH JAHN**

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

V nedávno publikované syntéze, v přírodě se vyskytujícího dihydronepetalaktonu,<sup>1</sup> byl klíčový olefin připraven Wittigovou reakcí v nepříliš uspokojivém výtěžku. Juliova olefinace, využívající kyselosti  $\alpha$ -protonů sulfonů, by tak mohla být vhodnější alternativou.

Avšak v tomto kroce syntézy byla u  $\beta$ , $\beta$ -silylovaného sulfonu za obvykle užívaných podmínek prokázána neobvyklá řízená *ortho*-metalační selektivita, nehledě na přítomnost kyselého  $\alpha$ -protonu<sup>2</sup>. Vzniklá aryl lithná sůl se po zahřátí následně transmetaluje na sulfonfylalkyl lithnou sůl.

Proto byl tento zajímavý jev prostudován na rozsáhlé škále větvených alkyl fenyl sulfonů. V tomto příspěvku bude prezentována studie reaktivity sulfonů s bázemi v závislosti na jejich struktuře<sup>3</sup> spolu s objasněním mechanismu transmetalace.



Získané poznatky byly využity v totální syntéze dihydropentalaktonu, jehož struktura je základem mnoha dalších cyklopentanioidních monoterpenů a jejich analogů. Tyto látky by pak byly dostupné pouze v sedmi reakčních krocích, což představuje jednu z nejkratších asymetrických syntéz.

Tato práce vznikla za podpory grantu P207/11/1598 (GA ČR), RVO: 61388963 (UOCHB AV ČR) a MSM0021620857 (MŠMT ČR).

#### LITERATURA

1. Jahn U., Hartmann P., Kaasalainen E.: *Org. Lett.* 6, 257 (2004).
2. Puget B., Jahn U.: *Synlett* 2010, 2579.
3. Řehová L., Císařová I., Jahn U.: *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 1461; DOI: 10.1002/ejoc.201301553.

#### FOTODEGRADOVATELNÉ INHIBITORY HIV PROTEASY

**JIŘÍ SCHIMER, MARCELA PÁVOVÁ, HANA PROUZOVÁ, JAN WEBER, PETR CÍGLER, PAVEL MAJER, JAN KONALINKA\***

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

HIV proteasa (HIV PR) je jeden z nejprostudovanějších enzymů a její inhibitory se staly jedním ze základních pilířů léčby pacientů s onemocněním AIDS<sup>1,2</sup>. I přes všechny znalosti, které o tomto enzymu máme, je ale stále řada klíčových dějů, na kterých se tento enzym podílí, ne zcela objasněna. HIV PR štěpí polyproteinové řetězce (Gag a Gag-Pol) na jednotlivé funkční proteiny, které vytvářejí vlastní virovou částici<sup>3</sup>. Pokud zainhibujeme aktivitu HIV proteasy, virové částice uvolněné z buněk jsou nezralé a neinfekční<sup>4</sup>. Plná role, kterou hraje HIV PR při dozrávání virionů a především při načasování přísně regulovaného děje, kdy dochází k vlastnímu štěpení polyproteinových řetězců, zatím není zcela objasněna. Zároveň také není zcela jasné, jestli se na štěpení polyproteinových řetězců podílejí také hostitelské proteasy, či jestli je štěpí pouze HIV PR.

Rozhodli jsme se, že vyvineme fotodegradovatelné inhibitory HIV PR, které by umožnily jednorázové rychlé aktivování enzymu v jakýkoliv okamžik, například v uvolněných nematurních virionech nebo ve chvíli pučení virionu, a který současně umožní synchronisaci procesu zrání virových částic ve tkáňové kultuře. Studováním maturace takto získaných virionů bychom poté mohli odpovědět na zcela základní otázky týkající se jejich dozrávání. Vyvinuli jsme dva pevně se vázající inhibitory HIV PR s různými fotodegradovatelnými značkami, které se po ozáření světlem o různých vlnových délkách rozpadají, přičemž ztrácejí inhibiční aktivitu (až o tři řády). První experimenty ukazují, že jsme schopni zničit krátkým osvitom o vhodné vlnové délce až 98 % původního inhibitoru a reaktivovat tak jinak zcela blokovanou HIV PR. Takto reaktivovaná HIV PR je plně funkční a je schopna štěpit chromogenní peptidový substrát i virový polyprotein HIV.

#### LITERATURA

1. Pokorná J., Machala L., Rezáčová P., Konvalinka J.: *J. Virol.* 1, 1209 (2009).
2. Schimer J., Konvalinka J.: *Curr. Pharm. Design* 19, 1 (2013); doi:10.2174/13816128113199990634.
3. Frankel A. D. Young J. A.: *Ann. Rev. Biochem.* 67, 1 (1998).
4. Seelmeier S., Schmidt H., Turk V. von der Helm K.: *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6612 (1988).

#### TEPLOTNÍ STRES V ROSTLINÁCH: MŮŽEME HO OVLIVNIT MANIPULACÍ HLADINY CYTOKININŮ?

**JAN SKALÁK<sup>a</sup>, MARTIN ČERNÝ<sup>a</sup>, PETR JEDELSKÝ<sup>b</sup>, EVA GE<sup>c</sup>, JANA DOBRÁ<sup>c</sup>, RADOMÍRA VAŇKOVÁ<sup>c</sup>, BŘETISLAV BRZOBOHATÝ<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř molekulární biologie rostlin, BFÚ AV ČR, a Mendlova univerzita v Brně, CEITEC MENDELU, 613 00 Brno; <sup>b</sup>PfF Univerzita Karlova, 128 43 Praha; <sup>c</sup>Ústav experimentální botaniky AV ČR, 165 02 Praha  
skalak.jan7@gmail.com

Rostliny jsou organismy podlehající změnám vnějších podmínek, které mohou mít pozitivní nebo negativní dopad na jejich růst a vývoj. Například extrémní výkyvy teplot mohou snížit výnos hospodářských plodin o 3-5 % při každém navýšení teploty o 1 °C nad teplotní optimum rostliny<sup>1</sup>. I když je teplotní signalizace pro rostliny evidentně velmi důležitá, o její molekulární podstatě toho mnoho nevíme. Naše nedávná práce ukazuje, že jedním ze signalizačních mechanismů by mohl být rostlinný hormon cytokinin. Pokusili jsme se proto prokázat, zda by bylo možné tohoto objevu využít a pomocí manipulace hladiny cytokininů zvýšit odolnost rostlin proti teplotnímu stresu.

Sledovali jsme účinky expozice teplotnímu stresu na aktivitu fotosyntézy a vitalitu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Abychom se co nejvíce přiblížili možným variacím teplotních extrémů v přírodě, byl stres aplikován nejen na celou rostlinu, ale také pouze na kořenový systém a pouze na

nadzemní část rostlin. Potenciální protektivní účinek cytokininů byl ověřován shodným experimentem s využitím transgenních rostlin, které po aktivaci dosahují až řádového nárůstu hladiny cytokininů. V pravidelných intervalech byly sbírány vzorky z kořenové a listové části. Následná analýza byla provedena na úrovni exprese vybraných genových markerů, hormonu a proteomu pomocí dvourozměrné elektroforézy. Jelikož je proteom velmi komplexní<sup>2</sup>, použili jsme pro vzorky z listové části imunoafinitní depleci Rubisco.

Získané výsledky potvrdily roli cytokininů v teplotní signalizaci a ukázaly, že jeho efekt koreluje s místem aplikace teplotního stresu. Regulace na hormonální a proteinové úrovni pak ukázaly na řadu procesů, které mohou pomoci pochopit mechanismy spojené s odezvou na teplotní stres, jako je pohyb průduchů, či ovlivnění fotosyntézy.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA206/09/2062 a P305/12/2144 (GAČR) a CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).*

#### LITERATURA

- Gornall J., Betts R., Burke E., Clark R., Camp J., Willet K., Wiltshire A.: *Phil. Trans. Royal Soc. B* 365, 2973 (2010).
- Černý M., Skalák J., Černá H. a Brzobohatý B.: *J. Proteom.* 92, 2 (2013); doi:10.1016/j.jprot.2013.05.040.

#### VYUŽITÍ *meta*-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ CALIX[4]ARENŮ K SYNTÉZE INHERENTNĚ CHIRÁLNÍCH RECEPTORŮ

**PETR SLAVÍK, KAROLÍNA FLÍDROVÁ, PAVEL LHOTÁK**

*Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6  
slavikp@vscht.cz*

Elektrofilní aromatická substituce na calixarenovém skeletu probíhá převážně do *para*-polohy vůči alkoxydové skupině na spodním okraji. V průběhu našeho výzkumu jsme pozorovali neobvyklou regiosektivitu při merkuračních reakcích vedoucích výhradně k *meta*-substituovaným derivátům<sup>1</sup>. Touto jednoduchou syntézou vznikají inherentně chirální deriváty, které je možné využít v následné syntéze chirálních receptorů.

Jednou z možností derivatizace je využití transmetalace rtuť palladiem a následná cross-couplingová reakce například s aryljodidy<sup>2</sup>. Kromě požadovaných derivátů vznikaly jako vedlejší deriváty neobvyklé calix[4]arenové dimery spojené C-C vazbou v *meta*-polohách. Další možností je přímá přeměna na halogenderiváty, které je opět možné podrobit cross-couplingovým reakcím.

V průběhu výzkumu byl připraven unikátní intramolekulárně přemostěný calix[4]arenový derivát **1** pomocí katalýzy palladiem a využitím trifenyllarsinu jako ligandu<sup>3</sup>. Tímto přemostěním dochází k výrazné změně tvaru kavity a tím i k ovlivnění komplexačních vlastností. Zároveň toto seskupení představuje "fluorenový" derivát, jehož specifická reaktivita byla využita k alkylaci calixarenového můstku.

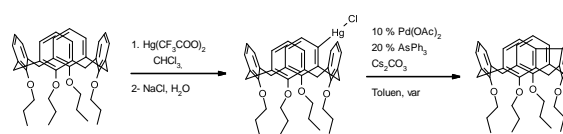


Schéma 1. Syntéza přemostěného calixarenového derivátu **1**

Intramolekulárním přemostěním calix[4]arenu v částečně kónické konformaci vznikají opět chirální deriváty, jejichž interakce s enantiomerně čistými látkami bude dále studována.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GAP207/12/2027.*

#### LITERATURA

- Slavík P., Dudic M., Flidrová K., Sykora J., Cisarova I., Böhm S., Lhotak P.: *Org. Lett.* 14, 3628 (2012).
- Slavík P., Flidrová K., Dvorakova H., Eigner V., Lhotak P.: *Org. Biomol. Chem.* 11, 5528 (2013).
- Flidrová K., Slavík P., Eigner V., Dvorakova H., Lhotak P.: *Chem. Commun.* 49, 6749 (2013).

#### KATALYTICKÁ HYDROGENOLÝZA DERIVÁTŮ CALIX[4]ARENU A JEJICH CHEMIE

**FRANTIŠEK STEJSKAL, PAVEL LHOTÁK**

*Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28  
Praha 6 – Dejvice  
frantisek.stejskal@vscht.cz*

V nedávné době byla publikována metoda selektivní katalytické hydrogenolýzy alkyl(aryl)etherů a arylpivalátů pomocí komplexů nulmocného niklu<sup>1</sup>. Má práce se zabývá aplikací této metody na calix[4]areny a následně výzkumem reaktivity těchto unikátních derivátů.

První část práce se zabývá syntézou výchozích derivátů vhodných pro katalytickou hydrogenolýzu. Pro deoxygenaci za použití silanu a fosfinového ligandu jsou vhodné pivaloyl estery calix[4]arenu. Z důvodu velké sterické náročnosti pivaloylové skupiny lze calix[4]aren derivatizovat pouze do stádia dipivaloylcalix[4]arenu. Dle prvotních experimentů na modelových látkách bylo zjištěno, že výrazně menší acetat podléhá deoxygenaci bez nebezpečí hydrolyzy esteru a lze tak připravit i více substituované deriváty calix[4]arenu.

Trialkylfosfinový ligand nicméně podléhá rozkladu za zvýšené teploty. Metoda byla tedy modifikována použitím karbenového ligandu a plynného vodíku<sup>2</sup>. Jelikož se karbenový ligand generuje působením báze, nelze použít estery jako výchozí látky. Z tohoto důvodu je potřeba připravit calix[4]arenové deriváty etherového typu. Jako ideální substituent je methoxy skupina díky malé velikosti. Karbenové ligandy jsou totiž výrazně stericky náročnější než fosfinové ligandy. Ukázalo se však, že tetramethoxycalix[4]aren je příliš bráněný a deoxygenace tak neprobíhá dle záměru.

Deoxygenované calixareny poskytují unikátní vhled do problematiky konformačního chování těchto látek a otevírají

možnost úplně nového směru derivatizace a přípravy neklasických receptorů.

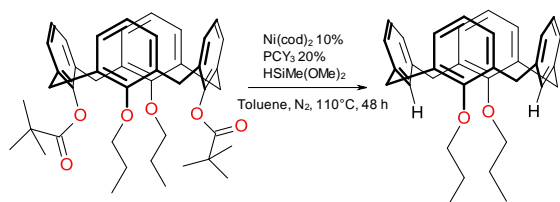


Schéma 1. Deoxygenace dipivaloyloxypoxycalix[4]arenu

Tato práce vznikla za podpory grantu GAP207/12/2027.

#### LITERATURA

1. Tobisu M., Yamakawa K., Shimasaki T., Chatani N.: Chem. Commun. 47, 2946 (2011).
2. Sergeev A., Hartwig J. F.: Science 332, 439 (2011).

#### N-KONCOVÁ DOMÉNA SESTRÍHOVÉHO FAKTORU U1-70K INTERAGUJE S SMN KOMPLEXEM A JE NUTNÁ PRO STABILITU JADERNÝCH GEMŮ

**EVA STEJSKALOVÁ<sup>a,b</sup>, DAVID STANĚK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav molekulární genetiky AVČR, v. v. i., 142 20 Praha 4;

<sup>b</sup>Přírodovědecká fakulta UK, 128 43 Praha 2

eva.stejskalova@img.cas.cz, david.stanek@img.cas.cz

SMN komplex je důležitý pro maturaci sestříhových faktorů a lokalizuje v cytoplazmě a jaderných tělíčkách, zvaných gemy. Snížená exprese proteinu SMN způsobuje spinální muskulární atrofii, smrtelné onemocnění nervové soustavy. Jedním z projevů této choroby na buněčné úrovni je ztráta gemů z jádra.

Protein U1-70K je součástí malé jaderné ribonukleoproteinové částice U1 (U1 snRNP), která se zapojuje do sestříhového komplexu a účastní se sestříhu intronů z pre-mRNA. Pomocí Försterova rezonančního přenosu energie a imunoprecipitací jsme prokázali, že U1 snRNP specificky interaguje s SMN komplexem v gemách a prostředníkem této interakce je protein U1-70K. Připravili jsme sadu mutantů U1-70K a zmapovali jsme jejich interakci s SMN komplexem. Jako klíčová pro tuto interakci se ukázala nestrukturovaná doména na N konci U1-70K.

Zjistili jsme, že po snížení exprese U1-70K pomocí RNA interference ztrácí HeLa buňky jaderné gemy, stejně jako po snížení exprese genu SMN. Tento fenotyp je zachraňován po exogenní expresi N-koncové nestrukturované domény zodpovědné za interakci U1-70K s SMN komplexem.

Objevíme nový faktor klíčový pro strukturní integritu jaderných gemů, sestříhový faktor U1-70K. Interakce důležitá pro integritu gemů je zprostředkována jeho nestrukturovanou N-koncovou doménou.

#### STUDIE INTRACELULÁRNÍ LOKALIZACE VISFATINU U ADIPOCYTŮ A HEPATOCYTŮ

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

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6;

<sup>b</sup>Fyziologický ústav, AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4  
svoboda-petr@tiscali.cz

V souvislosti s metabolickým syndromem je věnována pozornost nedávno objevenému adipokinu s enzymatickou aktivitou nesoucím název visfatin. Stále nevyřešenou otázkou představuje způsob jeho sekrece a s tím související intracelulární lokalizace. Prozatím nebyl objeven způsob regulace ani mechanismus tohoto procesu. Vzhledem k tomu, že aminokyselinová sekvence visfatinu postrádá N-terminální signální oblast pro vstup do klasické dráhy sekrece přes endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát, probíhá sekrece pravděpodobně některou z neklasických drah. Naším cílem bylo určit, v jakých kompartmentech buňky se visfatin nachází. Zároveň jsme sledovali lokalizaci visfatinu v průběhu buněčného cyklu a diferenciaci 3T3-L1 preadipocytů na adipocyty.

Modelové savčí linie byly: hepatocyty HepG2, 3T3-L1 preadipocyty a adipocyty. Diferenciace 3T3-L1 preadipocytů v adipocyty probíhala 8 dní a byla zahájena přidávkou dexamethasonu, isobutylmethylxanthinu a insulinu. Buněčný cyklus byl inhibován přidávkou nocodazolu, aphidicolinu a rapamycinu. Lokalizace visfatinu byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie na živých buňkách. Buňky byly transfekovány vektorem, který nese gen pro visfatin ve fúzi s GFP.

U buněk HepG2 a 3T3-L1 adipocytů jsme detegovali výrazně vyšší množství visfatinu v jádře ve srovnání s cytosolem. Visfatin se nenacházel uvnitř jiných membránových útvarů a ani nebyl s membránami asociován. U 3T3-L1 preadipocytů dochází ke změně lokalizace visfatinu mezi jádrem a cytosolem v závislosti na podmínkách. Pokud dochází k dělení a růstu buněk, je visfatin lokalizován výhradně v cytosolu. Jestliže má buňka zastaven buněčný cyklus v S fázi, je visfatin transportován do jádra. Z jádra je uvolněn ven až po jeho rozpadu při mitóze.

Výsledky u nediferencovaných preadipocytů naznačují, že transport visfatinu mezi jádrem a cytosolem má souvislost s jeho enzymatickou aktivitou v dodávání potřebného množství NAD<sup>+</sup> pro jaderné regulační pochody. Visfatin se u diferencovaných HepG2 hepatocytů a 3T3-L1 adipocytů pravděpodobně účastní stabilizace buňky v nedělicím stavu.

Práce vznikla za finanční podpory grantu GAČR 13-04580S, dále byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (rozhodnutí č. 20/2014).

## STRUKTURA A FUNKCE LEKTINU Z BAKTERIE *Burkholderia pseudomallei*

**PETRA SÝKOROVÁ<sup>a,b</sup>, GABRIEL DEMO<sup>b,c</sup>, LUCIA  
HÁRONÍKOVÁ<sup>a</sup>, MICHAELA WIMMEROVÁ<sup>a,b,c</sup>**

<sup>a</sup>Ústav biochemie a <sup>b</sup>NCBR, Přírodovědecká fakulta,  
Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; <sup>c</sup>CEITEC,  
Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
rozumova@mail.muni.cz

*Burkholderia pseudomallei* je tyčinkovitá bakterie, která se vyskytuje v kontaminované vodě a půdě převážně v tropických a subtropických oblastech jihovýchodní Asie. *B. pseudomallei* je lidský patogen, který způsobuje onemocnění zvané melioidóza. Díky rezistenci na antibiotika je léčba často velmi problematická a neúspěšná.

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které specificky a reverzibilně vážou sacharidy. Hrají tak důležitou roli při patologických i fyziologických rozpoznávacích procesech. Tyto proteiny mají také široké uplatnění v praxi. Mohou být využity ve farmacii, jelikož inhibitory lektinů lze použít při antiadhezivní terapii, dále k analytickým a preparativním účelům.

Charakterizace struktury proteinů je nezbytným předpokladem pro objasnění její funkce a má význam pro využití v aplikované sféře. Krystalizace biologických makromolekul proto představuje jeden z neefektivnějších nástrojů ve strukturní biologii.

Počáteční screening zahrnoval testování 1728 krystalizačních podmínek, které ukázalo vhodné prostředí pro růst krystalů: 0,2 M síran amonný, 0,1 M MES pH 6,5, 15% (w/v) PEG 5000 MME. Nejlepší krystaly byly získány další optimalizací a při tzv. uspořádání visící kapky. Experimenty ukázaly, že nejvhodnějším srážedlem v roztoku je 10-15% (w/v) PEG 6000. Tato optimalizace vedla k tvorbě krystalů s rozměry přibližně 0,52 x 0,06 x 0,05 mm a krystaly difraktovaly do rozlišení 1,83 Å. Difrakční data byla sbírána na synchrotronu Petra III (Hamburk, Německo). Krystaly patří do prostorové grupy I222 (kosočtverečná soustava). Parametry mřížky jsou a=46,07 Å, b=87,51 Å, c=159,29 Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Fázový problém se po mnoha pokusech s těžkými kovy podařilo vyřešit za použití DTPA-BMA-Eu komplexu.

Struktura studovaného lektinu naznačuje, že protein spadá do nové zatím nepopsané rodiny lektinů. Vyřešená struktura doplnila mozaiku výsledků řady funkčních a biologických experimentů a poslouží k pochopení interakce mezi bakterií a hostitelem.

*Tato práce vznikla za podpory projektů GAČR (13-25401S) a CEITEC - Středoevropský technologický institut (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu pro regionální rozvoj.*

## GLOBALNÍ EXPRESNÍ ANALÝZA MIKRORNA IDENTIFIKOVALA SADU 6-TI PROGNOSTICKÝCH MIKRORNA U PACIENTŮ S MULTIFORMNÍM GLIOBLASTOMEM

**JIRÍ ŠÁNA<sup>a,b</sup>, LENKA RADOVÁ<sup>b</sup>, RADEK LAKOMÝ<sup>a</sup>,  
LEOŠ KŘEN<sup>c</sup>, ANDREJ BEŠŠE<sup>a,b</sup>, PAVEL FADRUS<sup>d</sup>,  
ONDŘEJ SLABÝ<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup>Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické  
péče, Brno, <sup>b</sup>Středoevropský technologický institut, Masarykova  
univerzita, Brno; <sup>c</sup>FN Brno, Oddělení patologie, LF, Brno; <sup>d</sup>FN  
Brno, Oddělení neurochirurgie, LF, Brno  
slaby@mou.cz

Multiformní glioblastom (GBM) je nejčastěji se vyskytující maligní nádor mozku s mediánem celkového přežívání přibližně 13 měsíců od stanovení diagnózy. Ačkoliv je prognóza jednotlivých pacientů značně rozdílná, histologické profily tohoto nádorového onemocnění jsou si navzájem velmi podobné. Proto je velmi důležité najít takové molekulární markery, které by onkologům v klinické praxi umožnily s co největší přesností stanovit prognózu pacienta a predikovat odpověď na standardně podávanou adjuvantní konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem (RT/TMZ) a případně se tak rozhodnout pro intenzivnější či alternativní způsoby léčby, jež se v současné době začínají v léčbě GBM testovat. Z tohoto pohledu jsou nyní velmi diskutované mikroRNA (miRNA), krátké nekódující RNA, které posttranskripčně regulují genovou expresi a jejich deregulace tak výrazně ovlivňuje biologii mnoha nádorových onemocnění, nevyjímaje GBM.

Globální expresní analýza miRNA u 58 vzorků tkáně GBM a u 10 vzorků nenádorové mozkové tkáně identifikovala 28 významně deregulovaných miRNA, které byly schopny zpětně všechny zkoumané vzorky správně klasifikovat. Navíc korelace s klinickými daty pacientů identifikovala sadu 6-ti miRNA (miR-31, miR-224, miR-432\*, miR-454, miR-672, a miR-885-5p), která byla významně asociována jak s celkovým přežíváním, tak s přežíváním bez progresse onemocnění pacientů s GBM.

Stejná sada miRNA byla rovněž schopna u pacientů predikovat odpověď na léčbu RT/TMZ se 78% senzitivitou i specificitou (AUC = 0,803). Sada těchto 6-ti miRNA se tedy jeví jako slibný silný prognostický a prediktivní marker u pacientů s GBM a mohla by tedy umožnit rozhodnout se u prognosticky méně příznivých pacientů pro alternativní způsob léčby a přispět tak k prodloužení jejich celkového přežívání.

*Tato práce byla podpořena grantovým projektem NT13514-4/2012 MZČR a projektem "CEITEC - Středoevropský technologický institut" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).*



## CHIRÁLNÍ AMINY SE SEKUNDÁRNÍM POLYFLUORALKYLOVÝM ŘETĚZCEM JAKO PREKURZORY PRO NHC LIGANDY

ONDŘEJ ŠIMŮNEK\*, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ, JAROSLAV KVÍČALA

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

NHC ligandy (*N*-heterocyklické karbeny) jsou významnými ligandy přechodných kovů. Grubbsovy a Hoveydy-Grubbsovy katalyzátory pro metacezi alkenů jsou díky nim stabilnější a zároveň vykazují vyšší aktivitu oproti analogickým komplexům s fosfanovými ligandy. Naším cílem je příprava fluorofilních Hoveydy-Grubbsových katalyzátorů 2. generace s chirálními NHC ligandy, které budou sloužit pro enantioselektivní metaceze prochirálních substrátů. Přítomnost polyfluoralkylových řetězců v molekule katalyzátoru navíc umožní využít k jeho recyklaci fluorové separační techniky.

Vhodnými prekurzory pro takové NHC ligandy jsou aminy se sekundárním polyfluoralkylovým řetězcem **I**. Při jejich syntéze se s výhodou využívá Ellmanova chirální pomocná skupina<sup>1</sup>. Racemický amin **I** byl připraven v celkovém výtěžku 46 %. V případě použití enantiomerně čistého 2-methylpropan-2-sulfonamidu dochází ve druhém kroku ke stereoselektivní adici organolithného činidla. Po odstranění pomocné skupiny bezvodým chlorovodíkem a následné neutralizaci amoniové soli pak získáme enantiomerně čistý amin (Schéma 1).

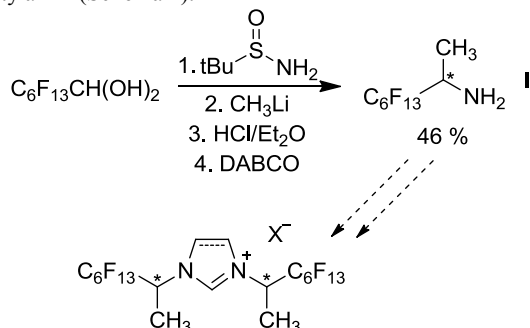


Schéma 1.

Připravené aminy mohou být dále cyklizovány za vzniku imidazoliových a dihydroimidazoliových solí – vlastních prekurzorů NHC ligandů.

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

### LITERATURA

- Mimura H., Kawada K., Yamashita T., Sakamoto T., Kikugawa Y.: *J. Fluorine Chem.* 131, 477 (2010).

## PRÍPRAVA NOVÝCH POTENCIÁLNE ÚČINNÝCH INHIBÍTOROV CHOLÍNESTERÁZ V LIEČBE ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

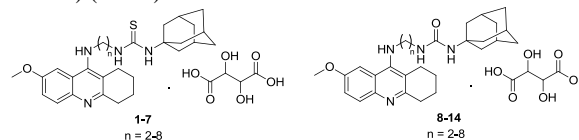
KATARÍNA ŠPILOVSKÁ<sup>a,b</sup>, JAN KORÁBEČNÝ<sup>a,b</sup>, KAMIL MUSÍLEK<sup>a,b</sup>, ANNA HOROVÁ<sup>a</sup>, KAMIL KUČA<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Katedra toxikologie, FVZ Univerzita obrany, 500 01 Hradec Králové; <sup>b</sup>Centrum biomedicínskeho výzkumu, FN Hradec Králové, 500 05 Hradec Králové; <sup>c</sup>Centrum pokročilých studií, FVZ Univerzita obrany, 500 01 Hradec Králové  
spilovska@pmfhk.cz

Alzheimerova choroba je neurodegeneratívne ochorenie charakterizované postupnou stratou pamäti. V súčasnej dobe sú k dispozícii liečivá pre Alzheimerovu chorobu. Ide o inhibítory cholinesteráz, a to takrín, donepezil, rivastigmin, galantamín a memantín. Takrín bol prvým inhibítorm acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7), avšak kvôli hepatotoxicite bolo jeho používanie zakázané. Jeho 7-methoxy derivát (7-MEOTA) vykazuje nižšiu toxicitu v porovnaní s takrínom.

Memantín (1-aminoadamantánový derivát) je nekompetitívny antagonista NMDA receptorov, ktorý inhibuje patologické funkcie spojené s týmto receptorom, zatiaľ čo fyziologické procesy učenia a pamäti zostávajú neovplyvnené.

Boli pripravené dve nové série 7-MEOTA-adamantylaminových heterodimérov (**1-14**) s rôznou dĺžkou reťazca a použitím Ellmanovej metódy testovaná ich schopnosť inhibovať obe cholinesterázy, ľudskú AChE (hAChE) a ľudskú butyrylcholinesterázu (hBChE, EC 3.1.1.8) (obr. 1).



Obr. 1. Nové potenciálne účinné inhibítory cholinesteráz

Bolo zistené, že všetkých 14 pripravených heterodimérov vykazuje inhibičnú aktivitu v mikromolárnych a niektoré aj v sub-mikromolárnych hodnotách. Ukázalo sa, že všetky novo pripravené zlúčeniny (**1-14**) sú lepšími inhibítormi hAChE aj hBChE v porovnaní so 7-MEOTOU. Na základe *in vitro* testovania sa preukázalo, že novo pripravené deriváty sú považované za selektívne inhibítory pre hBChE.

Tato práce vznikla za podpory Specifického výzkumu SV/FVZ201201, grantu GAČR P303/11/1907 a post-doktorantského projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0044.

### LITERATÚRA

- Spilovska K., Korabecny J., Kral J., Horova A., Musilek K., Soukup O., Drtinova L., Gazova Z., Siposova K., Kuca K.: *Molecules* 18, 2397 (2013).

## CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH LIDSKÝCH MEMBRÁNOVĚ VÁZANÝCH ENZYMŮ Z NADRODINÝ DEHYDROGENAS/REDUKTAS S KRÁTKÝM ŘETĚZCEM

**HANA ŠTAMBERGOVÁ, LUCIE ŠKARYDOVÁ, ADAM SKARKA, TEREZA LUNDOVÁ, BEATA MALČEKOVÁ, VLADIMÍR WSÓL**

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

Lidské membránově vázané enzymy podílející se na metabolismu karbonylových sloučenin představují velice zajímavou skupinu, ve které zůstává navzdory velkému úsilí vědců řada doposud necharakterizovaných proteinů včetně proteinů z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR).

V lidském genomu bylo doposud identifikováno 75 SDR zástupců, z nichž 1/3 tvoří necharakterizované většinou membránově vázané enzymy<sup>1</sup>. SDR enzymy se podílí na metabolismu steroidů, sacharidů, retinoidů či prostaglandinů a hrají tak důležitou roli nejen v řadě fyziologických dějů, ale i závažných onemocněních (např. hormon-dependentní nádory, metabolický syndrom, diabetes mellitus). Mimo to jsou zapojeny do biotransformace některých exogenních sloučenin. Bylo identifikováno několik SDR enzymů hrajících významnou roli v I. fázi biotransformace xenobiotik s karbonylovou skupinou (např. u doxorubicinu, dolasetronu, ketoprofenu), ale doposud jediný membránově vázaný zástupce, 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1<sup>2</sup>.

V tomto ohledu jsou zajímavou skupinou enzymů dehydrogenasy/reduktasy (SDR rodiny) tzv. DHRS enzymy. Ze 17 poměrně odlišných členů patří většina právě mezi necharakterizované membránově vázané proteiny. Pro lepší pochopení role některých DHRS v lidském organismu byly připraveny jejich rekombinantní formy s využitím bakulovirového expresního systému a hmyzích buněk *Spodoptera frugiperda*. U enzymů byla potvrzena mikrosomální lokalizace a následně specifikována topologie v endoplasmatickém retikulu. V rámci základní biochemické charakterizace vybraných DHRS enzymů (např. DHRS7, DHRS3) jsme se zaměřili na stanovení preference kofaktorů, identifikaci eobiotických a xenobiotických substrátů, purifikaci a následné převedení do rekonstitučního systému<sup>3,4</sup>. Navíc byla stanovena jejich exprese v lidských tkáních na úrovni mRNA a proteinů. Tento výzkum je slibným základem pro určení fyziologické a případně i patologické role těchto enzymů v lidském organismu.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Karlovy Univerzity (GAUK 677012/C/2012) a SVV 265004. Práce je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.

### LITERATURA

1. Persson B., Kallberg Y.: Chem. Biol. Interact. 202, 111 (2013).

2. Skarydová L., Wsól V.: Drug Metab. Rev. 44, 173 (2012).
3. Stambergova H., Skarydova L., Dunford J. E., Wsól V.: Chem. Biol. Interact. 207, 52 (2014).
4. Skarka A., Skarydová L., Stambergová H., Wsól V.: Protein Expr. Purif. 95C, 44 (2013).

### Spr0334, NOVÝ PROTEIN BUNĚČNÉHO DĚLENÍ U *Streptococcus pneumoniae*

**NELA ŠTEKEROVÁ, KAROLÍNA BURIÁNKOVÁ, ALEŠ ULRYCH, PAVEL BRANNY, LINDA NOVÁKOVÁ**

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč  
stekerova@biomed.cas.cz

Jedním z nejpozoruhodnějších dějů v biologii buňky je buněčný cyklus a především samotné buněčné dělení, kdy z jedné buňky mateřské vznikají dvě buňky dceřinné.

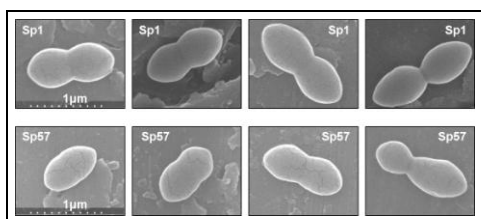
Většina studií bakteriálního buněčného dělení byla provedena u dvou hlavních modelových organismů tyčinkovitého tvaru, a to u *B. subtilis*, jako zástupce gram-pozitivních bakterií a u *E. coli*, jakožto zástupce gram-negativních bakterií.

*Streptococcus pneumoniae*, stejně jako většina ostatních streptokoků, laktokoků a enterokoků, patří mezi bakterie s ovoidním tvarem buněk. Ovoidní bakterie nemají tvar typicky kulovitý, ani typicky tyčinkovitý, jejich tvar je jakýmsi "přechodem" mezi těmito dvěma tvary. Tyto bakterie se vždy dělí ve stejné rovině, která je kolmá k dlouhé ose buňky. Navíc u těchto bakterií není známo, jakým způsobem určují místo vzniku buněčné přepážky, protože Min systém určující místo vzniku buněčné přepážky u tyčinkovitých bakterií zcela postrádají a proteiny zodpovědné za chromozomální okluzi nebyly u ovokoků dosud identifikovány<sup>1</sup>.

Spr0334 je hypotetický membránový protein o neznámé funkci. V nedávné studii bylo určeno, že tento protein je substrátem jediné Ser/Thr proteinkinasy StkP mezi jejíž substráty, mimo jiné, patří proteiny buněčného dělení: FtsZ, FtsA a DivIVA<sup>2, 3, 4</sup>. Samotná proteinkinasa StkP se též aktivně účastní buněčného dělení a delece genu *stkP* vede k defektům buněčného dělení a změně morfologie buněk, které mají protáhlý tvar a obsahují více neuzavřených buněčných přepážek<sup>4</sup>.

Naším cílem bylo určit funkci neznámého proteinu Spr0334 a vliv fosforylace na jeho funkci či aktivitu.

Deleci genu *spr0334* jsme vytvořili mutantní kmen *S. pneumoniae* a zkoumali jsme jeho fenotyp. Elektronová mikroskopie prokázala, že buněčné dělení u mutantního kmene probíhá asymetricky, buňky ztrácí typický ovoidní tvar a jsou různě deformované. Dceřinné buňky mají rozdílnou velikost (obr. 1), a menší buňka občas neobsahuje žádnou DNA.



Obr. 1. Elektronová mikroskopie divokého kmene a kmene  $\Delta spr0334$  *S. pneumoniae* Sp1: divoký kmen, Sp57: kmen  $\Delta spr0334$ . Snímky byly pořízeny skenovací elektronovou mikroskopií ve spolupracující laboratoři (Orietta Massidda; Università di Cagliari, Itálie)

Za účelem určit místa fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo* jsme vytvořili dva komplementační kmeny. Do postradatelného lokusu *bga* byla vnesena nativní alela a mutovaná forma alely pro gen *spr0334* pod indukibilním promotorem. Mutovaná forma genu pro protein Spr0334 měla zaměněné aminokyseliny T67 a T78 za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována. Následná studie exprese a fosforylace nativního a fosfoablativního proteinu Spr0334 prokázala, že T67 a T78 jsou místy fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*. Studie fenotypu těchto kmenů ukázala, že nefosforylovaný protein Spr0334 je schopný plně zastávat svou funkci.

Dále jsme vytvořili kmeny *S. pneumoniae* nesoucí v *bgaA* lokusu gen pro protein Spr0334 fúzovaný na N-konci s GFP. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme pozorovali lokalizaci a zjistili jsme, že protein GFP-Spr0334 je lokalizován převážně v buněčné přepážce a tato lokalizace se významně nemění v závislosti na jeho stavu fosforylace.

Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme pozorovali lokalizaci časných dělicích proteinů FtsZ a FtsA v mutantním kmeni  $\Delta spr0334$  a zjistili jsme, že FtsZ kruh je ve mnoha buňkách lokalizován asymetricky, což je příčinou asymetrického buněčného dělení. Pozorování fluorescenčně značeného proteinu Spr0334 exprimovaného současně s fluorescenčně značeným FtsA v buňkách divokého typu ukázalo, že Spr0334 je velmi časný protein buněčného dělení a je pravděpodobně důležitý pro správné umístění FtsZ kruhu v dělicí se buňce.

Závěrem lze shrnout, že Spr0334 je nově určený protein buněčného dělení, který pravděpodobně pomáhá určit místo tvorby nové dělicí přepážky a je nezbytný pro správný průběh buněčného dělení u *S. pneumoniae*.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR P204/07/082, P302/120256 a P207/2/1568 a grantu GA AV IAA600200801.

#### LITERATURA

- Zapun A., Vernet T., Picho M. G.: FEMS Microbiol. Rev. 32, 345 (2008).
- Nováková L., Bezoušková S., Pompach P., Špidlová P., Sasková L., Weiser J., Branny P.: J. Bacteriol. 192, 3629 (2010).
- Giefing C., Jelencsics K. E., Gelbmann D., Senn B. M., Nagy E.: Mikrobiology 156, 1697 (2010).
- Beilharz K., Nováková L., Fadda D., Branny P., Massidda O., Veening J. W.: Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 109, E905 (2012).

## PYRIMIDIN-CYKLODEXTRINOVÉ KONJUGÁTY JAKO KATALYZÁTORY OXIDACÍ SULFIDŮ

JIRÍ ŠTURALA, RADEK CIBULKA

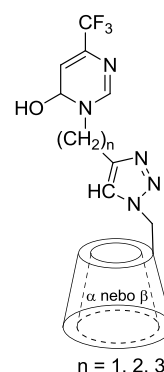
Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6  
jiri.sturala@vscht.cz

Opticky čisté sulfoxidy představují velmi důležité látky jak v organické syntéze jako chirální pomocné skupiny, tak např. ve farmaceutickém průmyslu jako biologicky aktivní látky. Nejčastějším způsobem přípravy sulfoxidů je oxidace příslušných sulfidů. Heterocyklické peroxidy<sup>1</sup>, jejichž nejznámějším zástupcem je flavin-hydroperoxid, oxidují velmi účinně sulfidy na sulfoxidy.

V poslední době s rozvojem chirálních organokatalyzátorů se tento přístup začíná uplatňovat i v oblasti přípravy chirálních sulfoxidů. Ukázalo se, že spojením flavinového katalyzátoru s cyklodextrinem<sup>2</sup> lze získat sulfoxidy s velmi vysokými *ee*.

Zjednodušením flavinového skeletu lze mimo jiné získat mnohem snáze dostupné pyrimidinové soli, které jsou také účinnými katalyzátory oxidací sulfidů.

Pro spojení katalyticky aktivního pyrimidinového jádra s chirálním cyklodextrinem byla použita moderní „click reakce“. Výsledný pyrimidin-cyklodextrinový konjugát byl testován pro oxidaci modelových i farmaceuticky zajímavých sulfidů. V prezentaci bude diskutován rovněž vliv délky spojky na výslednou enantioselektivitu oxidace katalyzované konjugáty.



Obr. 1. Pyrimidin-cyklodextrinové konjugáty

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/12/0447.

#### LITERATURA

- Gelalcha F. G.: Chem. Rev. 107, 3338 (2007).
- Mojr V., Buděšínský M., Cibulka R., Kraus T.: Org. Biomol. Chem. 9, 7318 (2011).

## PREFERENČNÍ VAZBA MUTANTNÍCH FOREM PROTEINU P53 K SUPERHELIKÁLNÍ DNA OBSAHUJÍCÍ STRUKTURNĚ SPECIFICKÉ MOTIVY

VLASTIMIL TICHÝ, LUCIE NAVRÁTILOVÁ, MATĚJ ADÁMIK, ROBERT HELMA, MARIE BRÁZDOVÁ

Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno  
vlastik@ibp.cz

Pro standardní formu proteinu p53 (wtp53) bylo zjištěno, že jeho nádorové supresorová funkce vyžaduje sekvenčně specifickou vazbu k promotorům cílových genů. Mutantní hot-spot proteiny p53 (mutp53) se však nemohou vlivem mutace v centrální DNA-vazebné doméně (DBD) vázat k DNA sekvenčně specificky<sup>1</sup>. Přesto byla pozorována jejich schopnost regulace exprese cílových genů<sup>2</sup>. Studium sekvenčně specifické vazby u proteinu wtp53 odhalilo význam topologie DNA pro selektivní vazbu k rozpoznávané sekvenci DNA<sup>3</sup>. Za strukturně specifickou vazbu k DNA je u proteinu p53 zodpovědná především druhá DNA-vazebná doména (CTDBD) na C-konci proteinu, jejíž aktivita je také u proteinů mutp53 zachována<sup>4</sup>.

Z tohoto důvodu jsme zkoumali vliv topologie DNA na interakci vybraných proteinů mutp53 s různými typy DNA bez nebo s cílovým vazebným místem pro protein mutp53 (cit.<sup>5</sup>). Naše práce ukazuje, že použité proteiny mutp53 vykazovaly preferenci k plazmidové superhelikální DNA (scDNA) oproti lineární nebo relaxované DNA (linDNA, relDNA) bez ohledu na přítomnost specifické sekvence. Podobné výsledky jsme získali také při použití přirozeně se vyskytujícího vazebného místa proteinu mutp53 v promotoru genu *MSP/MST1*, a to jak s purifikovanými proteiny, tak buněčnými lyzáty. Pro potvrzení významné role domény CTDBD při rozpoznávání topologie DNA byly u proteinu mutp53 R273H použity monoklonální protilátky rozpoznávající různé epitopy jak N-koncové, tak C-koncové části proteinu. Vliv topologie DNA na vazbu proteinů mutp53 byl detegován také *in vivo* využitím reportérových vektorů obsahujících promotory genů *BAX* nebo *MSP/MST1*.

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

### LITERATURA

- Gohler T., Jager S., Warnecke G., Yasuda H., Kim E., Deppert W.: Nucl. Acids Res. 33, 1087 (2005).
- Quante T., Otto B., Brázdová M., Kejnovská I., Deppert W., Tolstonog G.V.: Cell Cycle 11, 3290 (2012).
- Brázdová M., Quante T., Toggel L., Walter K., Loscher C., Tichý V., Cincárová L., Deppert W., Tolstonog G.V.: Nucl. Acids Res. 37, 1486 (2009).
- Kim E., Deppert W.: Biochem Cell Biol 81, 141 (2003).
- 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).

## SYNTEZA A VYUŽITÍ TETRAFLUORETHYLAČNÍCH ČINIDEL

JIŘÍ VÁCLAVÍK, YANA CHERNYKH, BRONISLAV JURÁSEK, PETR BEIER\*

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

Organofluorové molekuly se v přírodě téměř nevyskytují<sup>1</sup>. Přesto si vybudovaly silnou pozici mezi léčivy, agrochemikáliemi, moderními materiály apod.<sup>2</sup>, což je hlavní příčinou velké poptávky po účinných metodách zavádění atomů fluoru do organických molekul.

Metody vnesení tetrafluorethylové ( $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{H}$ ) nebo tetrafluorethylenové ( $-\text{CF}_2\text{CF}_2-$ ) skupiny do cílové molekuly jsou do velké míry neprozkoumány. Beier a kol. v posledních letech publikovali tandemové činidlo  $\text{PhSO}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{SiMe}_3$  (**1**) (radikál-anion), jehož využitelnost předvedli na nukleofilních a radikálových adicích<sup>3,4</sup>.

Oxidací látky **1** bylo připraveno činidlo  $\text{PhSO}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{SiMe}_3$  (**2**), které bylo studováno v nukleofilních adičních reakcích na aldehydy (Schéma 1). Ukázalo se, že ve srovnání s činidlem **1** je toto méně reaktivní, což je pravděpodobně dáno elektronakceptorní sulfonylovou skupinou, která snižuje nukleofilitu činidla. Experimentální výsledky jsou doplněny DFT výpočty studií v programovém balíku *Gaussian 09*.

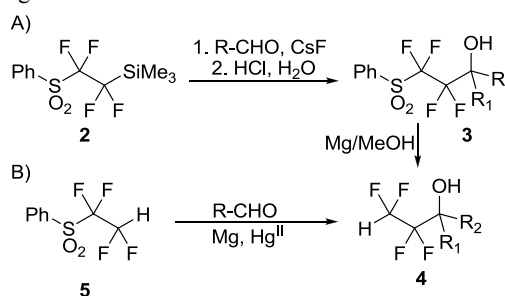


Schéma 1. Studované reakce činidel **2** a **5**

Pozornost byla dále věnována syntéze látek **4**, a to buď desulfonylací připravených aduktů **3**, nebo přímou adicí činidla  $\text{PhSO}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{H}$  (**5**) na aldehydy.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P207/11/0421.

### LITERATURA

- Harper D. B., O'Hagan D.: Nat. Prod. Rep. 11, 123 (1994).
- Kirsch P.: *Modern Fluoroorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- Chernykh Y., Hlat-Glembová K., Klepetářová B., Beier P.: Eur. J. Org. Chem. 2011, 4528 (2011).
- Chernykh Y., Opekar S., Klepetářová B., Beier, P.: Synlett 23, 1187 (2012).

## PŘÍPRAVA TRANSGENNÍCH ORGANISMŮ PRO PRODUKCI OSMOTINU

JITKA VIKTOROVÁ, PETRA LOVECKÁ, LUKÁŠ KRÁSNÝ, TOMÁŠ MACEK

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6  
tomas.macek@vscht.cz

Tato práce byla zaměřena na rekombinantní produkci rostlinného proteinu osmotinu. Osmotin se v rostlinách účastní odpovědi na stresory biotického i abiotického původu. Již dříve byly publikovány antimikrobiální účinky osmotinu vůči některým patogenním plísním.

Gen kódující osmotin (*OSM*) byl za účelem následných genetických manipulací amplifikován pomocí PCR s využitím genomové DNA tabáku virginského jako templátu. Gen *OSM* ve fúzi s oligonukleotidem kódujícím hexahistidinovou kotvu byl jako součást plasmidu pET-22b exprimován v buňkách *Escherichia coli* BL21. Po ověření úspěšné exprese a lokalizace byl rekombinantní osmotin purifikován a renaturován. Nativní konformace izolovaného proteinu byla ověřena metodami MALDI TOF MS a infračervené a Ramanovy spektroskopie.

Rekombinantní osmotin byl použit k testování jeho antimikrobiálních účinků vůči potravinářským a lidským patogenům. Výraznou antimikrobiální aktivitu jeví osmotin např. proti původcům kandidóz a zánětů zvukovodu (*Candida parapsilosis* a *Candida tropicalis*) a proti potravinářským patogenům *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora globosa* a *Saccharomyces ludwigii* způsobujícím např. kysnutí vína a moštů. Současně byla zkoumána i případná toxicita osmotinu vůči lidským embryonálním ledvinovým buňkám a jeho hemolytická aktivita, výsledky testů však prokázaly, že osmotin je i ve vysokých koncentracích pro lidské buňky neškodný.

Jako druhý expresní systém byl zvolen modelový rostlinný druh tabák virginský. Kódující sekvence *His-OSM* byla vložena do vektoru pGreen0029 pod kontrolu konstitutivního promotoru viru kvěťkové mozaiky. Získaný plasmid byl následně vložen do kmene *Agrobacterium tumefaciens* C58-C1. Účinná transientní exprese genu *His-OSM* byla metodou agrobakteriální infiltrace ověřena v dvouděložných i jednoděložných rostlinách. Metodou agrobakteriální kokultivace byly připraveny transgenetické rostliny tabáku nesoucí gen *OSM*. Transgen byl v těchto rostlinách detegován na úrovni DNA a počet inkorporovaných kopií byl určen pomocí kvantitativního PCR. Kvantifikace mRNA prokázala silnou expresi transgenu.

Sledováním klíčivosti semen a obsahu chlorofylu v přítomnosti NaCl byla prokázána zvýšená tolerance transgenetických rostlin tabáku k osmotickému stresu. Rostliny tabáku se zvýšenou produkcí osmotinu se tak mohou stát užitečným modelem pro uplatnění genu *OSM* při přípravě zemědělských plodin se zvýšenou tolerancí k biotickému i abiotickému stresu.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 501/11/1650.

## SYNTÉZA FUNKCIONALIZOVANÝCH Ru(II) KOMPLEXŮ

BEÁTA VILHANOVÁ, PETR ŠOT, JIŘÍ VÁCLAVÍK, MAREK KUZMA, PETR KAČER

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
beata.vilhanova@vscht.cz

Komplexy typu  $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-aren})(N\text{-arylsulfonyl-DPEN})]$  (kde DPEN = 1,2-difenylythylen-1,2-diamin) jsou využitelné nejen jako katalyzátory asymetrických hydrogenačních reakcí<sup>1</sup>, ale také jako účinná cytostatika<sup>2</sup>. Syntéza těchto komplexů vychází z dimeru  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-aren})]_2$ , který se připravuje reakcí příslušného derivátu 1,4- nebo 1,3-cyklohexadienu s hydratovaným chloridem ruthenitým (Schéma 1).

Syntéza požadovaných cyklohexadienů **1** se obvykle provádí Birchovou redukcí. Vzhledem k potenciálním rizikům spojeným s touto reakcí je vítanou alternativou cykloadiční reakce substituovaného buta-1,3-dienu a termínálního alkynu<sup>3</sup>, která byla využita i v této práci.

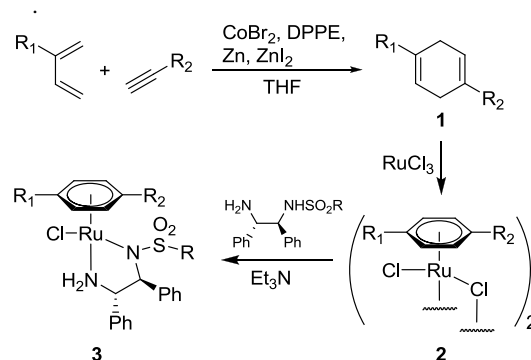


Schéma 1. Syntéza funkcionalizovaných komplexů

Syntetizované cyklohexadieny **1** byly charakterizovány a bylo zjištěno, že vznikající vedlejší produkt má jinou strukturu oproti literatuře. Produkty **1** byly použity pro syntézu dosud nepublikovaných dimerů **2** a následně polosendvičových komplexů **3** s ligandy typu *N*-arylsulfonyl-DPEN. Připravené látky již nacházejí uplatnění při modulárním designu a syntéze heterogenních katalyzátorů s využitím vnesení funkčních skupin na  $\eta^6\text{-aren}$  a budou testovány na cytostatické účinky.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR P106/12/1276.

## LITERATURA

- Václavík J., Šot P., Vilhanová B., Pecháček J., Kuzma M., Kačer P.: *Molecules* 18, 6804 (2013).
- Yan Y. K., Melchart M., Habtemariam A., Sadler P. J.: *Chem. Commun.* 2005, 4764.
- Cheung F. K., Hayes A. M., Morris D. J., Wills M.: *Org. Biomol. Chem.* 5, 1093 (2007).

**ÚLOHA N-TERMINÁLNÍ DOMÉNY  $\alpha$ /TIF32  
PODJEDNOTKY INICIAČNÍHO FAKTORU eIF3 VE  
VAZBĚ mRNA NA 43S PREINICIAČNÍ KOMPLEXY**

**VLADISLAVA VLČKOVÁ<sup>a</sup>, STANISLAVA  
GUNIŠOVÁ<sup>a</sup>, SOHAIL KHOSHNEVIS<sup>b</sup>, TOMÁŠ  
KOUBA<sup>a</sup>, PIOTR NEUMANN<sup>b</sup>, PETRA  
BEZNOSKOVÁ<sup>a</sup>, RALF FICNER<sup>b</sup>, LEOŠ SHIVAYA  
VALÁŠEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř regulace genové exprese, Mikrobiologický ústav  
AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4;

<sup>b</sup>Institut pro mikrobiologii a genetiku, George-August  
University, 37077 Goettingen, Německo  
vladislava.vlckova@natur.cuni.cz

Syntéza proteinů je klíčovým procesem každé buňky, a proto je její bezchybná regulace nezbytná pro každý žijící organismus. Jedním z nejregulovanějších kroků genové exprese je iniciace translace, zajišťující sestavení 80S ribosomu ze 40S a 60S ribosomálních podjednotek a iniciátorové tRNA na AUG iniciačním kodónu mRNA, jež má být translatována. Jelikož se jedná o velmi složitý proces, správný průběh iniciace translace je řízen mnoha eukaryotickými iniciačními faktory (eIFs).

Navzdory důležitosti iniciace translace v genové expresi není stále zcela znám přesný mechanismus několika

jejich klíčových kroků. Jedním z nich je nasedání mRNA na 43S preiniciační komplex (43S PIC). Nejnovější studie však naznačily, že kromě eIF4F a poly(A) vazebného proteinu by mohl v tomto kroku hrát důležitou úlohu taktéž iniciační faktor eIF3.

V naší laboratoři jsme nedávno identifikovali 10-ti alaninovou substituci (tzv. *Box37*) v  $\alpha$ /TIF32 podjednotce faktoru eIF3 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která specificky ovlivnila iniciaci translace. Podrobná analýza ukázala, že jediným efektem této mutace na iniciaci translace je podstatné snížení množství modelové mRNA ve 48S preiniciačních komplexech izolovaných z frakcí gradientu. Nedávno objevená struktura N-terminální části  $\alpha$ /TIF32 navíc odhalila dva zásadité aminokyselinové zbytky v oblasti Boxu37 - Arg363 a Lys364 - tvořící kladně nabitou oblast na povrchu proteinu  $\alpha$ /TIF32 potenciálně schopnou vazby mRNA. Substituce těchto aminokyselin na alaniny taktéž narušila krok nasedání mRNA na 43S PIC *in vivo*, což naznačuje, že N-terminální část  $\alpha$ /TIF32 podjednotky faktoru eIF3 hraje významnou roli ve vazbě mRNA na 43S preiniciační komplexy.

*Tato práce vznikla za podpory grantů Wellcome Trust Grant 090812/Z/09/Z a GAČR 305/10/0335.*



SIGMA-ALDRICH



Chemické listy



Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu

Člen IUBMB a FEBS



## REJSTŘÍK AUTORŮ

Adámik, Matěj	521, 523, 556	Hamulřáková, Slávka	534
Amatov, Tynchtyk	521	Hanáková, Zuzana	533
Arlt, Volker M.	522	Hároníková, Lucia	529, 552
Babič, Martin	524, 525	Havel, Václav	530
Babula, Petr	522, 533	Havlík, Jan	548
Ballová, Ludmila	522	Helma, Robert	556
Bárta, František	522	Hidasová, Denisa	530
Bártek, Jiří	533	Hlaváček, Antonín	531
Bařinka, Cyril	547	Holý, Petr	525
Bäumlová, Adriana	523	Horčic, Martin	531
Bažantová, Pavla	523	Horová, Anna	553
Beier, Petr	556	Horváth, Peter	532
Bendl, Jaroslav	528	Hošek, Jan	532, 533
Bešše, Andrej	552	Chercheja, Serghei	538
Beznosková, Petra	558	Chernykh, Yana	556
Bodwell, Graham J.	525	Chromá, Katarína	533
Bouřa, Evžen	523	Jahn, Ullrich	521, 524, 530, 537, 548
Brabec, Viktor	534	Jančařík, Andrej	538
Branny, Pavel	554	Jančaříková, Gita	534
Brázda, Václav	529	Janeba, Zlatko	546
Brázdová, Marie	521, 523, 556	Janočková, Jana	534
Brezovský, Jan	528	Jedelský, Petr	549
Brychtová, Yvona	545	Jurásek, Bronislav	556
Brzobohatý, Břetislav	549	Jurásková, Ivana	535
Bubnov, Alexej	545	Kacířová, Miroslava	535
Buček, Aleš	524	Kačer, Petr	557
Bugala, Juraj	524, 525	Kádek, Alan	535
Buchta, Michal	525	Kaleta, Jiří	536
Buriánková, Karolína	554	Kamlar, Martin	536
Calogero, Raffaele	526	Kapras, Vojtěch	537
Cibulka, Radek	555	Kašpárková, Jana	534
Cígler, Petr	548, 549	Keprová, Alena	537
Cimová, Viera	524, 525	Khoshnevis, Sohail	558
Cišařová, Ivana	526	Kinsky, Slavomir	528
Coufal, Radek	526	Klán, Petr	532, 544
Cvačka, Josef	529	Kleinová, Renata	537
Čechová, Lucie	546	Klívar, Jiří	538
Černá, Kateřina	526	Kohout, Michal	538, 545
Černý, Martin	549	Konalinka, Jan	549
Čeřovský, Václav	527	Konrádová, Daniela	546
Čujová, Sabína	527	Kopecská, Miroslava	539
Damborský, Jiří	528	Korábečný, Jan	534, 553
Demo, Gabriel	552	Kotek, Vladislav	540
Dobrá, Jana	549	Kouba, Tomáš	558
Dostál, Zdeněk	526	Kozmik, Václav	531
Doubek, Michael	545	Kozubíková, Hana	546
Dračínský, Martin	546	Kožurková, Mária	534
Drahoňovský, Dušan	526	Kraiczová, Veronika	540
Dron, Paul I.	536	Králik, Petr	543
Dulavová, Eva	537	Kramara, Juraj	533
Dvořák, Dalimil	540	Krásný, Lukáš	557
Dvořák, Pavel	528	Krčková, Zuzana	541
Elicharová, Hana	528	Krivosudský, Lukáš	541
Epp, Trevor	538	Křen, Leoš	537, 552
Fadrus, Pavel	537, 552	Křížová, Edita	551
Ficner, Ralf	558	Křížová, Ivana	537
Flidrová, Karolína	550	Kubienová, Lucie	540
Fojta, Miroslav	521	Kuča, Kamil	534, 553
Frei, Eva	522	Kukačka, Zdeněk	539
Füzik, Tibor	542	Kulich, Pavel	543
Ge, Eva	549	Kurumbang, Nagendra P.	528
Gorris, Hans H.	531	Kuzma, Marek	557
Grešáková, Veronika	528	Kvičala, Jaroslav	532, 553
Grones, Jozef	524, 525	Lakomý, Radek	537, 552
Grúz, Jiří	546	Lamattina, Lorenzo	540
Gunišová, Stanislava	558	Langerová, Hana	542
Gyepes, Róbert	541	Levová, Kateřina	522
Hadravová, Romana	537	Lhoták, Pavel	550
Hájek, Miroslav	537	Lindner, Wolfgang	538
Háková, Eva	529	Lovecká, Petra	557

Luhová, Lenka	540	Skerra, Arne	547
Lundová, Tereza	554	Skládal, Petr	531
Macek, Tomáš	557	Skuhrová Francová, Hana	545
Macůrek, L.	544	Slabý, Ondřej	537, 552
Machová, Iva	542	Slampa, Pavel	537
Majer, Pavel	549	Slavík, Petr	550
Malčeková, Beata	554	Snášel, Jan	542
Malčíková, Jitka	545	Srovnal, Josef	527
Malenovská, Hana	543	Staněk, David	551
Maletinská, Lenka	543	Stará, Irena G.	525, 538
Man, Petr	535, 539	Starý, Ivo	525, 538
Martinec, Jan	541	Stejskal, František	550
Matoušková, Petra	524	Stejskalová, Eva	551
Medalová, Jiřina	544	Stiborová, Marie	522
Michl, Josef	536	Svatoš, Aleš	524
Mikel, Pavel	543	Svoboda, Jan	526
Mistrík, Martin	533	Svoboda, Jiří	531, 545
Modrianský, Martin	527	Svoboda, Petr	551
Moricová, Pavla	540	Sychrová, Hana	528
Moudrý, Pavel	533	Sýkorová, Petra	552
Mráz, Marek	526	Šána, Jiří	537, 552
Musílek, Kamil	553	Šebej, Peter	532, 544
Nagelová, Veronika	543	Šebesta, Petr	524
Navrátilová, Lucie	521, 523, 556	Šigutová, Kamila	551
Neumann, Piotr	558	Šimunek, Ján	541
Nováček, Jiří	535	Šimunek, Ondřej	553
Nováková, Linda	554	Šindelář, Vladimír	530
Nováková, Martina	547	Škarydová, Lucie	554
Novotná, Vladimíra	531, 545	Škop, Vojtěch	551
Obšil, Tomáš	535	Šlegerová, Jitka	548
Obšilová, Veronika	535, 539	Šmejkal, Karel	533
Oppelt, Jan	526	Šot, Petr	557
Pastierik, Tomáš	544	Špilovská, Katarína	553
Pavlová, Šárka	545	Štacko, Peter	544
Pávová, Marcela	549	Štaffová, Kateřina	527
Pečinka, Petr	523	Štambergová, Hana	554
Pecháčková, Soňa	544	Štekerová, Nela	554
Petr, Marek	521	Štěpánek, Miroslav	535
Petrivalský, Marek	540	Šturala, Jiří	555
Pichalová, Růžena	542	Tauchman, Jiří	535
Pichová, Iva	524, 542	Tesařík, Radek	543
Pisačková, J.	544	Tichý, Boris	545
Plevová, Karla	545	Tichý, Vlastimil	556
Polášková, Alena	523	Tobman, Tomáš	540
Poryvai, Anna	545	Tošner, Zdeněk	526
Pospíšil, Jiří	546	Ulbrich, Pavel	542
Pospíšilová, Šárka	526, 545	Ulrych, Aleš	554
Procházková, Eliška	546	Václavík, Jiří	533, 556, 557
Prokop, Zbyněk	528	Valášek, Leoš Shivaya	558
Prouzová, Hana	549	Valentová, Olga	541
Ptáček, Jakub	547	Vaňková, Radomíra	549
Radová, Lenka	527, 552	Vašíčková, Petra	543
Richter, Antonia	547	Večeř, Jaroslav	535
Richterová, Klára	547	Veselý, Jan	535, 536
Rogers, Charles T.	536	Viktorová, Jitka	557
Ruml, Tomáš	542	Vilhanová, Beáta	557
Rumllová, Michaela	537	Vlčková, Vladislava	558
Rybáček, Jiří	538	Vogel, Heiko	524
Rybáčková, Markéta	532, 553	Vrkoslav, Vladimír	529
Řehoř, Ivan	548	Weber, Jan	549
Řehová, Lucie	548	Weißflog, Jerrit	524
Řezáčová, P.	544	Wimmerová, Michaela	534, 552
Řezábková, Lenka	535	Wolrab, Denise	538
Sebera, Martin	527	Wsól, Vladimír	554
Sedláček, Radislav	528	Zídek, Václav	551
Sedláčková, Michaela	527	Zídková, Jarmila	551
Sedlmeier, Andreas	531	Železná, Blanka	543
Schimer, Jiří	549		
Schmeiser, Heinz H.	522		
Schwendt, Peter	541		
Skalák, Jan	549		
Skarka, Adam	554		

