XXI. biochemický sjezd

České společnosti pro biochemii a molekulární biologii
a Slovenské spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu

České Budějovice

14. – 17. září 2008

PROGRAM
SBORNÍK PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ

www.csbmb08.cz

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

BIOLOGICKÉ CENTRUM

ČESKÁ SPOLEČNOST PRO BIOCHEMII A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

SEZNAM VYSTAVUJÍCÍCH FIREM

www.alchimica.cz www.laboratornichemikalie.cz	www.anamet.cz	europe.appliedbiosystems.com	www.Immunotech.cz
www.biorad.com	www.biotech.cz	www.bdal.cz	www.dialab.cz
www.donaulab.com	www.eastport.cz	www.eppendorf.com	www.exbio.cz
www.genetica.cz	www.goro.cz	www.helago.cz	www.hpst.cz
www.malecentrum.cz	www.krd.cz	www.labmark.cz	www.lacomed.cz
www.lach-ner.com	www.lach-ner.com	www.lgcstandards.com	www.lonza.cz
www.merci.cz	www.merck.cz	www.mt.com	www.mgp.eu
www.millipore.com	www.p-lab.cz	www.roche.cz	www.schoeller.cz
www.sigmaaldrich.com	www.sipoch.cz	www.spectronex.cz, www.thermo.com	www.trigon-plus.cz
www.unimed.cz	www.vidia.cz	at.vwr.com	www.waters.cz

XXI. biochemický sjezd

České společnosti pro biochemii a molekulární biologii
a Slovenské spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu

České Budějovice, 14. – 17. září 2008

PROGRAM
SBORNÍK PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ

Published by: JPM Tisk s.r.o.
2008

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

vítejte v Českých Budějovicích na 21. biochemickém sjezdu. Scházíme se zde jen díky pochopení a mimořádné vstřícnosti vedení a pracovníků Jihočeské univerzity a Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, a proto oběma jmenovaným institucím a jejich pracovníkům patří náš dík.

Sjezd a jeho úroveň tvoří lidé, kteří se na něm sejdou. Chci proto poděkovat řadě vynikajících představitelů naší biochemie a molekulární biologie, kteří buďto převzali roli organizátorů a předsedů sekcí, nebo souhlasili s aktivní účastí jako přednášející. Bez jejich zkušeností, znalostí a kontaktů by sjezd nemohl splnit svoji funkci. Zvláštní dík patří prof. Antonínu Holému a jeho belgickému spolupracovníkovi prof. Erikovi DeClercq za jejich ochotu zúčastnit se sjezdu, přednést své plenární přednášky a nechat nás tak nahlédnout do jejich velmi úspěšného oboru medicinální chemie.

Je obtížné a vlastně nevhodné chválit předem, dokonce i slibovat, ale tento předkládaný program snad dává naději na zajímavou prezentaci výsledků biochemického výzkumu mnoha pracovišť jak ze Slovenska, tak z České republiky. Musíme si uvědomit, že nejde o úplný přehled naší biochemie, výběr řečníků i prezentace posterů jsou zatíženy výrazným prvkem náhody – ne každý oslovený měl čas a možnost se zúčastnit. Nicméně, v okamžiku, kdy jde tento sborník do tisku, obsahuje 357 abstrakt vědeckých sdělení (4 plenární přednášky, 128 přednášek v sekcích a 225 posterů). Já osobně budu mít problém vybrat si některou z 3 až 4 paralelních sekcí, které všechny považuji za velmi kvalitně obsazené.

Sjezd se těší mimořádnému zájmu odborných firem, jejichž užitečné informace všichni využijeme v další práci. Ne nepodstatná je také finanční podpora sjezdu z jejich strany.

Zvláštností tohoto sjezdu je sekce Středoškolské odborné činnosti. Umožňujeme zcela začínajícím zájemcům o vědeckou práci účast a možnost prezentace svých prvních výsledků. Přijměte tyto mladé adepty mezi sebe, oni budou v budoucnosti představovat naši biochemii!

Všichni víme, že účast na sjezdu nepřinese bezprostřední scientimetrické ukazatele, avšak jsem přesvědčen, že pro mladé pracovníky bude sjezd zdrojem poučení i možností vlastní prezentace, pro zkušené badatele bude místem, kde mohou získat obdiv a zájem ze strany mladých a zajistit si tak kontinuitu svého výzkumu do budoucnosti. Takže, kdo přijel do Českých Budějovic, neprohloupil. Věřím, že tento sjezd bude důstojnou generálkou na FEBS kongres, který organizujeme v Praze příští rok.

Pojďme a naplňme tuto vizi!

V Plzni 18. srpna 2008

Radim Černý
místopředseda ČSBMB
organizátor sjezdu

Předseda sjezdu

prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc.

Místopředseda sjezdu

prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.

Čestné předsednictvo

prof. PhDr. Václav Bůžek, CSc.
rektor Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.
děkan Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc.
předseda České společnosti pro biochemii a molekulární biologii

prof. RNDr. František Sehnal, CSc.
ředitel Biologického centra Akademie věd České republiky

Mgr. Juraj Thoma
primátor statutárního města Českých Budějovic

prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.
předseda Slovenské spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu

Vědecký výbor

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA (předseda)
prof. MUDr. Radim Černý, CSc.
prof. RNDr. Karel Bezouška, DrSc.
prof. MUDr. Jan Borovanský, CSc.
doc. Mgr. Jiří Damborský, Dr.
prof. RNDr. Libor Grubhoffer,CSc.
prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc.
MUDr. Josef Houštěk, DrSc.
prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.
prof. RNDr. Milan Kodíček, CSc.
doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.
RNDr. Jan Kopecký, DrSc.
prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.
Mgr. Jan Pačes, Ph.D.
doc. RNDr. Petr Skládal, Ph.D.
prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.
doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.
prof. RNDr. Jiří Wilhelm, Ph.D.
doc. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Organizační výbor

prof. MUDr. Radim Černý, CSc. (předseda)
prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.
Ing. Irena Krumlová
Zina Pecková
Mgr. Ján Štěrba
doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.
Ing. František Vrtiška

Organizační sekretariát sjezdu

Congress Business Travel, s.r.o. (CBT)

Zina Pecková
Lidická 43/66
150 00 Praha 5 – Anděl

e-mail: csbmb08@cbttravel.cz
web: www.csbmb08.cz
tel: + 420 224 224 646, + 420 224 942 575 / 579
fax: + 420 224 942 550

MÍSTO KONÁNÍ SJEZDU

Jihočeská univerzita a Biologické centrum AV ČR v Českých Budějovicích

Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Areál budov se nachází na západním okraji Českých Budějovic poblíž sídliště Šumava, ve směru na Holašovice.

Možnost parkování pro osobní vozy je v areálu.

VÝSTAVA FIREM

Výstava odborných firem je umístěna ve foyeru a v prostorách JU.

STRAVOVÁNÍ

Během přestávek se bude podávat káva/čaj a malé občerstvení.
Obědy se budou podávat ve studentské menze, která se nachází v areálu JU a BC od 13:00 do 14:00.

SPOLEČENSKÝ PROGRAM

NEDĚLE, 14. ZÁŘÍ 2008

- **Slavnostní zahájení a úvodní přednáška (16:30 – 19:00)**
  (zahrnuto v registračním poplatku)

- **Společenský večer (19:00 – 22:00)**
  (zahrnuto v registračním poplatku, vstupenka pro doprovodnou/neregistrovanou osobu 300 Kč)
  Pohoštění formou bufetu.

PONDĚLÍ, 15. ZÁŘÍ 2008

- **Divadelní představení (20:15 – 23:00)**
  (zahrnuto v registračním poplatku, vstupenka pro doprovodnou/neregistrovanou osobu 200 Kč)

ÚTERÝ, 16. ZÁŘÍ 2008 – EXKURZE

- **Výlet na Kleť (14:30 – 20:00)**
  cena 360 Kč/osobu obsahuje dopravu autobusem, cesta lanovkou, návštěva observatoře Kleť spojená s odborným výkladem (návštěva jedné z kopulí observatoře, za jasného počasi projekce Slunce dalekohledem, výstava astronomických fotografií komet a planetek) a doprovod průvodce (maximální možný počet osob je 40, výlet může být z povětrnostních a provozních důvodů zrušen s plnou náhradou celkové částky)

- **Historická procházka Českými Budějovicemi s odborným výkladem (16:00 – 18:00)**
  cena 100 Kč/osobu

- **Prohlídka pivovaru Budějovický Budvar včetně multimediální expozice „Příběh Budějovického piva“ (15:00 – 18:00)**
  cena 150 Kč/osobu (maximální počet účastníků je limitován 50 osobami)

- **Selské baroko – návštěva obce Holašovice – památka zapsaná na seznamu UNESCO (15:00 – 18:00)**
  cena 300 Kč/osobu (minimální počet účastníků je 25 a maximální 40)

REGISTRAČNÍ POPLATKY

	do 15. 6. 2008	od 16. 6. 2008	na místě
člen ČSBMB + SSBMB	2 800 Kč	3 300 Kč	3 800 Kč
ostatní účastníci	3 300 Kč	3 800 Kč	4 300 Kč
studenti (účastníci do 30-ti let)	1 800 Kč	2 300 Kč	2 800 Kč
jednodenní registrace	1 000 Kč	1 000 Kč	1 000 Kč

REGISTRAČNÍ POPLATEK ZAHRNUJE:

- vstup na odborná jednání
- vstup na výstavu firem
- tištěné sjezdové materiály (program a sborník abstrakt)
- obědy a občerstvení během přestávek
- slavnostní zahájení a společenský večer 14. 9. 2008
- divadelní představeni 15. 9.

JEDNODENNÍ REGISTRACE

15. 9. 2008	barva jmenovky ČERVENÁ
16. 9. 2008	barva jmenovky ZELENÁ
17. 9. 2008	barva jmenovky ŽLUTÁ

REGISTRAČNÍ HODINY

neděle, 14. 9. 2008	14:00 – 19:00
pondělí, 15. 9. 2008	08:00 – 18:00
úterý, 16. 9. 2008	08:00 – 14:00
středa, 17. 9. 2008	08:00 – 18:00

INTERNETOVÝ KOUTEK

Volný přístup na internet bude k dispozici v 1. patře JU. Koutek je otevřen v době shodné s registračními hodinami (omezený počet PC).

PŘEDNÁŠKY

Pro přednášející bude zajištěna prezentační technika pro projekci z PC (PC bude k dispozici, není možné použití vlastního laptopu). Žádáme přednášející, aby předali své prezentace technikovi v sále včas, nejpozději během přestávky před začátkem své sekce a na CD (z bezpečnostních důvodů USB pouze jako záloha).

POSTERY

Rozměry posterů jsou: 240 cm výška × 90 cm šířka, povrch bílé lamino, připevnění oboustrannou lepenkou.

PROGRAM SJEZDU

Neděle 14. 9. 2008

SÁL A

16:30 Zahájení sjezdu, projevy hostů

16:45 Zprávy předsedů ČSBMB a SSBMB (V. Pačes, J. Turňa)

17:05 Vyhlášení cen J. V. Koštíře a A. Beckmana
(V. Pačes, představitelé firem Biotech, a.s. a Immunotech, a.s.)

17:15 Zpráva o přípravě kongresu FEBS v Praze (T. Zima)

17:20 Úvahy o reformě vědy v ČR (V. Pačes)

Přestávka

18:00 **Plenární přednáška / SÁL A**
Předsedající: Radim Černý

Václav Hořejší:
Membránové mikrodomény a imunoreceptorová signalizace

19:00 ***Společenský večer v areálu Jihočeské univerzity***

Pondělí 15. 9. 2008

8:30 – 9:20 **Plenární přednáška / SÁL A**
Předsedající: Libor Grubhoffer

Antonín Holý, Petr Jansa:
Acyklické nukleosidfosfonáty po dvaceti letech – perspektivy v roce 2008

9:30 – 13:00 **Jednání v sekcích**

Molekulární imunologie / SÁL B
Předsedající: Václav Hořejší, Vladimír Leksa

9:30 O1
Dráber P.: **Membránové signalosomy**

10:00 O2
Leksa V., Schiller H. B., Kutejová E., Stockinger H.: **Konvergencie a divergencie bunkovej proteolýzy kontrolovanej receptorom pre manóza 6-fosfát**

PROGRAM

10:30 O3
Šebo P., Adkins I., Basler M., Benada O., Bumba L., Fišer R., Holubová J., Kamanová, J., Kofroňová, O., Konopásek, I., Krůšek, J., Linhartová, I., Mašín, J., Morová, J., Osička, R., Osičková, A., Staněk, O., Šimšová, M., Vojtová, J.: **Jak přelstít fagocyty prezentující antigeny: Molekulární triky toxinu zvyšujícího hladinu cAMP**

11:00 – 11:20 ***Přestávka***

11:20 O4
Bezouška K.: **Lektiny bez afinity k sacharidovým ligandům? Hledání ligandu pro aktivační receptory přirozených zabíječských buněk a jejich využití v nádorových terapiích**

11:50 O5
Černý J.: **Role proteinu AHNAK ve vápníkové signalizaci a exocytóze**

12:20 O6
Novák M., Zilka N., Skrabana R.: **Neusporiadany protein "tau" v patogeneze Alzheimerovej choroby**

Xenobiochemie / SÁL A

Předsedající: Marie Stiborová, Albert Breier

9:30 O7
Anzenbacher P., Anzenbacherová E., Otyepka M., Hudeček J.: **Rozdíly ve flexibilitě aktivních center P450**

10:00 O8
Hudeček J., Hodek P.: **Interakce cytochromů P450 se substráty: Kolik a jak?**

10:30 O9
Stiborová M., Frei E.: **Role cytochromu P450 a peroxidas v metabolické aktivaci a intoxikaci protinádorového preparátu ellipticinu**

11:00 – 11:20 ***Přestávka***

11:20 O10
Wsól V.: **Význam lidské aldo-keto-reduktasy v metabolismu xenobiotik**

11:45 O11
Ulrichová J., Šimánek V.: **Sanguinarin – biologická aktivita *in vitro* a *in vivo***

12:10 O12
Breier A., Barančík M., Sulová Z.: **ABC-transportéry pri bunkovej ochrane proti toxickému stresu**

12:35 O13
Machala M., Zatloukalová J., Šimečková P., Umannová L., Krčmář P., Pěnčíková K., Andrysík Z., Vondráček J.: **Xenobiochemie není dnes jen vědou o biotransformaci cizorodých látek – efekty aromatických sloučenin na signální transdukci a mezibuněčnou komunikaci**

PROGRAM

Rostlinná biochemie a molekulární biologie / SÁL C

Předsedající: František Vácha, Ivo Frébort

9:30 Úvodní slovo

9:35 O14
Oborník M.: ***Chromera velia* – objev fotosyntetického předchůdce parazitických prvoků skupiny *Apicomplexa***

10:05 O15
Zažímalová E.: **Polární transport rostlinného hormonu auxinu na buněčné úrovni: Jak dovnitř a jak ven?**

10:35 O16
Frébort I., Galuszka P., Pospíšilová H., Frébortová J., Novák O.: **Metabolické přeměny cytokininů u rostlin a kvasinek; Metabolic conversions of cytokinins in plants and yeast**

11:05 – 11:25 ***Přestávka***

11:25 O17
Matoušek J., Podzimek T., Poučková P., Lipovová P., Orctová L., Stehlík J.: **Rekombinantní apoptotické rostlinné nukleázy a analýza jejich protinádorových a biologických aktivit**

11:55 O18
Šebela M., Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., JSnégaroff J.: **Struktura a funkce aminoaldehyd-dehydrogenasy u semenáčků hrachu Structure and function of pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase**

12:25 O19
Ristvejová J., Lapkouski M., Sovová Ž., González-Pérez S., Kopecký V. Jr., Revuelta J. L., Arellano J. B., Ettrich R.: **Structural analysis of PsbP protein of the oxygen-evolving complex from *Spinacia oleracea***

14:00 – 17:30 **Jednání v sekcích**

Molekulární a buněčná biologie I. / SÁL A

Předsedající: Pavel Hozák, Albert Breier

14:00 Hozák P.: Úvodní slovo

14:05 O20
Hampl A.: **Poučí nás lidské embryonální kmenové buňky o mechanismech vzniku nádoru?**

14:35 O21
Motlík J., Šašková A., Šolc P., Baran V., Kubelka M.: **Cílené změny v expresi protein kináz a protein fosfatáz řídících znovuzahájení a dokončení meiózy myších oocytů**

15:05 O22
Vítězka ceny Drobnicova memoriálu: Ohraďanová A., Gradin K., Baráthová M., Zaťovičová M., Holotňaková T., Kopáček J., Poellinger L., Pastoreková S., Pastorek J.: **Hypoxia regulates expression of endosialin, a marker of tumour angiogenesis**

15:40 – 16:00 *Přestávka*

16:00 O23
Slabý O., Sobková K., Garajová I., Svoboda M., Fabian P., Šachlová M., Šmerdová T., Knoflíčková D., Vyzula R.: **Genová exprese Heat shock proteinu 110 je zvýšená během progrese kolorektálního karcinomu**

16:20 O24
Ondrušová L., Vachtenheim J.: **Histonacetyltransferasy PCAF a hGCN5 jako koregulátory aktivity transkripčního faktoru microphthalmia**

16:40 O25
Pluskalová M., Grebeňová D., Kuželová K., Halada P., Hrkal Z.: **Mapování signální adhezní dráhy v leukemických buňkách JURL-MK1 po účinku chemoterapeutik**

17:00 O26
Vítěz Ceny J. V. Koštíře: Heneberg P.: **Nádorové kmenové buňky: Převrat v názorech na vznik a progresi nádorového bujení**

Proteiny a peptidy / SÁL B

Předsedající: Jan Konvalinka, Andrea Bellová

14:00 Úvodní slovo předsedajícího

14:10 O27
Jiráček J., Žáková L., Kazdová L., Hančlová I., Protivínská E., Šanda M., Buděšínský, M.: **Analogy insulinu s modifikacemi v poloze B26. Divergence vazebné afinity a biologické aktivity**

14:40 O28
Šedo A., Bušek P., Stremeňová J., Křepela E.: **Dipeptidylpeptidasa-IV a příbuzné molekuly: pro- nebo antionkogenní funkce v lidských astrocytárních nádorech?**

15:10 O29
Osička R., Sadílková L., Šulc M., Linhartová I., Novák P., Šebo P.: **Jednokroková afinitní purifikace rekombinantních proteinů založená na samoštěpícím modulu proteinu FrpC bakterie Neisseria meningitidis**

15:40 – 16:00 *Přestávka*

16:00 O30
Rulíšek L., Kožíšek M., Svatoš A., Buděšínský M., Muck A., Bauer M., Kotrba P., Ruml T., Havlas Z., Linse S.: **Použití fragmentů proteinových struktur k návrhům peptidových sekvencí selektivně vázajících ionty kovů**

16:25 O31
Bellová A., Gažová Z., Imrich J., Kristian P., Daxnerová Z., Tomaščiková J.: **Searching for acridine derivatives with antiaggregating activity**

16:50 O32
Holada K.: **Priony a prionový protein: vlastnosti a funkce**

17:15 O33
Kennedy M., Wildgoose J., McKena T., Hughes Ch., Giles K., Pringel S., Campuzano I., Langbride J., H. Bateman R.: **A data independent approach for protein identification and simultaneous quantification**

Biochemie nádorů / SÁL D

Předsedající: Jan Borovanský, Ján Sedlák

14:00 Borovanský J.: Úvodní slovo

14:05 O34
Hrstka R., Müller P., Vojtěšek B.: **Heterogenita mutací proteinu p53 a jejich význam v terapii nádorových onemocnění**

14:27 O35
Sedlák J., Jakubíková J., Bodo J., Duraj J., Bao Y.: **Mnohonásobné účinky izotiokyanátov v nádorových bunkách**

14:50 O36
Václavíková R., Nordgard S., Alnaes GA., Hubáčková M., Hlavatá I., Kubačková K., Kodet R., Mrhalová M., Pecha V., Kristensen VN., Gut I.,Souček P.*: Diagnostické a therapeutické centrum, Praha*): **Úloha genů ABC transportérů v rezistenci nádorů prsu**

15:15 O37
Lipšová A., Vachtenheim J., Borovanský J.: **Antioxidační ochrana nádorových buněk a možnosti jejího cíleného ovlivňování**

15:45 – 16:05 ***Přestávka***

16:05 O38
Dobrota D., Bittšanský M., Sivák Š., Jankovič P., Poláček H.: **Možnosti využitia 1H a 31P magnetickej rezonančnej spektroskopie pri štúdiu a diagnostike nádorových ochorení mozgu**

16:25 O39A
Springer D., Zima T.: **Současnost a budoucnost nádorových markerů**

16:45 O39B
Hajdúch M.: **Predikce účinnosti protinádorové léčby v onkologii – Správná léčba správnému pacientovi ve správném čase**

17:05 O40
Pešta M., Topolčan O., Sutnar A., Liška V., Třeška V., Holubec L. a Černý R.: **Klinický význam exprese CEA, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 u pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu**

17:25 Sedlák J: Závěrečné slovo

PROGRAM

Viry, bakterie, paraziti: struktura a funkce jejich molekul / SÁL C

Předsedající: Libor Grubhoffer, Gustáv Russ

14:00 Úvodní slovo

14:05 O41
Stulík J., Pávková I., Strašková A., Hernychová L., Lenčo J.: **Proteomová analýza membránových proteinů kmenů Francisella tularensis lišících se virulencí pro člověka: Strukturní a funkční studie DsbA a VacJ homologních proteinů**

14:35 O42
Mašín J., Fišer R., Bumba L., Osičková A., Basler M., Krůšek J., Osička R., Konopásek I., Šebo P.: **Adenylate Cyclase Toxin Translocation Across Target Cell Membrane: Avoiding the Pore**

15:05 O43
Barák I., Muchová K., Pavlendová N., Chromiková Z.: **Bacterial cell division – how the cell finds its center**

15:35 – 15:55 ***Přestávka***

15:55 O44
Russ G., Košík I., Krejnusová I., Bystrická M., Poláková K.: **Vlastnosti protilátok špecifických pre PB1-F2 protein virusu chripky typu**

16:20 O45
Horváth A.: **Čo nového v oxidačnej fosforylácii trypanozomatíd?**

16:45 O46
Ulbrich P., Voráčková I., Haubová Š., Rimpelová S., Ruml T.: **Studium tvorby retrovirových částic a jejich terapeutické využití**

17:10 O47
Kopáček P., Horn M., Sojka D., Franta Z., Pěničková H., Caffrey, C.R., Mareš M. **Trávicí peptidázy ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus***

20:15 ***Divadelní představení***

Úterý 16. 9. 2008

8:30 – 12:00 **Jednání v sekcích**

Molekulární a buněčná biologie II. / SÁL A

Předsedající: Pavel Hozák, Jozef Timko

8:30 Úvodní slovo

8:35 O48
Vítěz Ceny Arnolda Beckmana – genomika, genetika: Hřebíček M.; Kmoch S., Mrázová L., Majewski J., Nosková L., Hartmannová H., Ivánek R., Čížková A., Poupětová H., Sikora J., Uřinovská J., Stránecký V., Zeman J.: **Mutations in TMEM76 are associated with acetyl coenzyme A: α-glucosaminide N acetyltransferase deficiency in mucopolysaccharidosis type III C (Sanfilippo C) patients**

9:05 O49
Vítězka Ceny Arnolda Beckmana – buněčná biologie a imunologie:
Dráberová L.: **Komplexnost aktivačních dějů na plasmatické membráně**

9:35 O50
Brnáková Z., Godány A.: **Nukleázy u *Streptomyces aureofaciens* a *Streptomyces coelicolor***

10:05 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O51
Olejníková P., Lakatoš B., Hudecová D., Varečka Ľ.: **Adaptative changes in the succinate transport into mycelia of *Trichoderma viride***

10:50 O52
Vidová B., Godány, A.: **Využitie povrchových proteínov *Streptococcus agalactiae* na detekciu a vývoj vakcíny**

11:10 O53
Lauková M., Tillinger A., Vargovič P., Petrák J., Križanová O., Kvetňanský R.: **Modulation of adrenergic receptor´s gene expression in the spleen of rats exposed to repeated immobilization stress**

11:30 O54
Vargovič P., Petrák J., Ukropec J., Kvetňanský R.: **Stress-Induced Changes in Gene Expression of Adrenergic Receptors in Rat Adipose Tissues**

PROGRAM

Bioenergetika / SÁL C

Předsedající: Josef Houštěk, Jordan Kolarov

8:30 O55
Lukeš J., Hashimi H., Čičová Z., Novotná L.: **Editování mitochondriálních RNA v trypanosomách**

9:00 O56
Kmoch S., Čížková A., Stránecký V., Tesařová M., Havlíčková V., Paul J., Ivánek R., Hansíková H., Kaplanová V., Vrbacký M., Hartmannová H., Nosková L., Honzík T., Drahota Z., Magner M., Hejzlarová K., Zeman J., Houštěk J.: **Nový faktor v biogenezi savčí ATP syntázy**

9:25 O57
Kutejová E., Ondrovičová G., Bauer J.: **ATP – dependentní proteázy a biogeneze mitochondrií (ATP – dependent proteases and biogenesis of mitochondria)**

9:40 O58
Stibůrek L.: **Biogeneze savčí cytochrom c oxidázy**

9:55 O59
Šmigáň P., Nováková Z., Majerník A.:**Zmeny v ATP syntetizujúcom systéme u mutantov *ethanothermobacter thermautotrophicus* rezistentných k inhibítorom syntézy ATP**

10:10 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O60
Pravenec M., Houštěk J., Kazdová L., Kurtz T.W.: **Vliv mitochondriálního genomu na rizikové faktory diabetu 2. typu**

10:55 O61
Polčic P., Drobcová B., Kiššová I., Mentel M., Kolarov J.: **Úloha mitochondrií v programu buněčné smrti**

11:20 O62
Kůs V., Pražák T., Brauner P., Hensler M., Kuda O., Flachs P., Janovská P., Medříková D., Rossmeisl M., Jílková Z., Štefl B., Drahota Z., Houštěk J., and Kopecký J.: **Svalová netřesová termogeneze u myší indukovaná vysokotukovou dietou, význam v rezistenci k obezitě**

11:35 O63
Vrbacký M., Drahota Z., Mráček T., Pecinová A., Houštěk J.: **Glycerol-3-fosfátem indukovaná produkce reaktivních forem kyslíku v savčích mitochondriích**

11:50 O64
Kiššová I., Deffieu M., Salin B., Manon S., Camougrand N.:
Regulace mitofagie v kvasinkách (Regulation of mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*)

PROGRAM

Proteinové inženýrství a biotechnologie / SÁL B

Předsedající: Jiří Damborský, Martin Fusek

8:30 O65
Martínková L., Křen V.: **Sekvenční a integrované chemoenzymové reakce: Nové trendy v aplikaci biokatalýzy**

8:55 O66
Vítěz Ceny J. V. Koštíře:
Prokop Z., Pavlová M., Koudeláková T., Klvaňa M., Mozga T., Chaloupková R., Damborský J.: **Inženýrství stereoselektivity enzymů pro aplikace biokatalýzy**

9:20 O67
Biedermannová L., Vondrášek J., Kuchař M., Li J., Petroková H., Jeřábek P., Šebo P.: **Umíme vylepšit vazebnou doménu receptoru pro gama interferon?**

9:45 O68
Šabatková Z., Šafařík I., Šafaříková M.: **Using catalase and invertase from magnetically responsive *Saccharomyces cerevisiae* cells**

10:10 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O69
Mandl M., Omesová Pokorná B., Janiczek O.: **Growth kinetics of sulfur-oxidizing bacteria and kinetic models**

10:55 O70
Čikošová M.: **Velkoobjemová produkce proteinů a enzymů: Nové trendy v biotechnologiích**

11:20 O71
Fusek M.: **Proteinové inženýrství a farmaceutický průmysl – bioléčiva**

11:45 – 12:00 Závěrečné slovo a společná diskuse

Volné radikály v biochemii / SÁL D

Předsedající: Jiří Wilhelm, Zdenka Ďuračková

8:30 O72
Wilhelm J.: **Úvod. Reduktivní stres jako předpoklad stresu oxidativního**

8:38 O73
Ďuračková Z., Muchová J.: **Súčasný pohľad na oxidačný stres a antioxidanty**

8:53 O74
Drahota Z.: **Volné radikály a mitochondrie**

9:08 O75
Paduchová-Chovanová Z.: **Oxidačné poškodenie DNA a reparačná schopnosť ako marker oxidačného stresu**

PROGRAM

9:23 O76
Kubala L., Schmelzer K.R., Hammock B.D., Lojek A., Eiserich J.P.:
Myeloperoxidasová modulace metabolitů arachidonátu a linolátu in vivo

9:38 O77
Wilhelmová N., Procházková D., Lubovská Z., Wilhelm J.: **Volné radikály u rostlin**

9:53 O78
Kaplán P., Tatarková Z., Babušíková E., Sivoňová M., Račay P., Lehotský J., Dobrota D.: **Oxidačné poškodenie lipidov a bielkovín v srdci potkana počas starnutia**

10:08 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O79
Pospíšil P.: **Použití elektronové paramagnetické rezonance na detekci volných radikálů v biologických systémech**

10:40 O80
Vytášek R.: **Úloha volných radikálů v gykooxidačních reakcích**

10:50 O81
Kalousová M., Jáchymová M., Mestek O., Tesař V., Zima T.: **Oxidační stres u pacientů s onemocněním ledvin- RAGE (receptor pro produkty pokročilé glykace) – polymorfismy, solubilní RAGE**

11:00 O82
Skoumalová A., Wilhelm J.: **Volné radikály při rozvoji Alzheimerovy choroby**

11:10 O83
Bernátová I., Pecháňová O.: **Úloha NO v experimentálnej hypertenzii**

11:20 O84
Muchová J.:**Biomodulačná aktivita prírodných polyfenolových látok**

11:30 Společná diskuse

12:10 -13:00 Plenární přednáška / SÁL A

Předsedající: Libor Grubhoffer

Erik De Clercq:
Antiviral activity of acyclic and cyclic nucleoside phosphonates

Oběd

Volné odpoledne

PROGRAM

Středa 17. 9. 2008

8:30 – 12:00 **Jednání v sekcích:**

Biochemie lipidů a membrán / SÁL B

Předsedající: Jan Kopecký, Ivan Hapala

8:30 Úvod slovo

8:35 O85
Tvrzická E.: **Mastné kyseliny – strukturní součást lipidů**

9:00 O86
Rossmeisl M., Jílková Z., Jeleník T., Hensler M., Mohamed-Ali V., Bryhn M., Berge K., Holmeide A.K., Kopecký J.: **n-3 PUFA a chemické deriváty dokosahexaenové kyseliny v prevenci a léčbě obesity a porušené glukosové tolerance u myši na vysokotukové dietě**

9:25 O87
Jeleník T., Rossmeisl M., Kůs V., Kopecký J.: **The effect of dietary EPA/DHA ratio and dosage on the development of obesity and metabolit disorder in mice fed a high-fat diet**

9:40 O88
Medríková D., Janovská P., Jílková Z., Rossmeisl M., Kopecký J.: **Influence of LC-PUFA intake during perinatal period on metabolism of skeletal muscle and possible programming of energy metabolism**

9:55 O89
Cahová M., Vavřínková H., Daňková H., Marková I., Kazdová L.: **Zvýšená aktivita lysozomální lipázy podmiňuje vznik inzulínové rezistence v játrech u dietně navozené steatózy**

10:10 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O90
Kazdová L., Hubová M., Cahová M., Pravenec M.: **Věkem indukované změny sekrece adipocytokinů, antilipolytického účinku inzulinu a tkáňové inzulinové rezistence u modelů metabolického syndromu**

10:50 O91
Jilkova Z., Kus V., Medrikova D., Janovska P., Pavelka S., Kopecky J.: **Significance of AMP-activated protein kinase for the effect of leptin**

11:05 O92
Štich V.: **Regulace lipolysy v tukové tkáni: sledování in vivo pomocí mikrodialyzy**

11:25 O93
Hapala I., Mrózová Z., Czabany T, Špaňová M., Valachovič M.: **Regulacia metabolizmu neutralnich lipidov u kvasinek *S. cerevisiae***

11:45 O94
Griač P., Šimočková M., Holič R., Tahotná D., Patton-Vogt J.: **Kvasinková fosfolipáza C (Pgc1) sa podieľa na kontrole množstva fosfatidylglycerolu v mitochondriách**

PROGRAM

Glykobiochemie / SÁL C

Předsedající: Marek Šebela, Katarína Mikušová

8:30 O95
Bezouška K.: **Renesance sacharidové biochemie v současném biomedicinském výzkumu: od intermediátů metabolismu po sacharidový informační kód a léčiva sladká uvnitř i na povrchu**

9:10 O96
Smetana K. Jr.: **Příklady využití průkazu galektinu-1, -2 a -3 a jejich glykoligandů v biologii buňky a diagnostice**

9:40 O97
Grubhoffer L., Hajdušek O., Vancová M., Stěrba J., Rudenko N.: **Glykobiochemie klíšťat – přenašečů závažných onemocnění: sacharidy vázající proteiny a glykany**

10:10 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O98
Mikušová K., Makarov V., Moellmann U., Riccardi G., Cole S.T.: **Syntéza mykobakteriálnej dekaprenylfosfoarabinózy – nový cieľ pre pôsobenie účinných antituberculotik**

10:55 O99
Kostlánová N., Mikušová K., Wimmerová M.: **Optimizing of mycobacterial glycosyltransferases expression in *Escherichia coli* – the way for problematic proteins**

11:20 O100
Mrázek H., Pompach P., Manglová D., Weignerová L., Křen V., Bezouška K.: **Proteomický a glykoproteomický výzkum plísňové α-N-acetylgalaktosaminidasy, zajímavého enzymu z *Aspergillus niger* s α-galaktosidasovou aktivitou**

11:40 O101
Malinovská L., Brůnová L., Dejmková E., Wimmerová M.: **Surface plasmon resonance as an efficient tool in lectin research**

Biochemie a středoškolská odborná činnost / SÁL D

Předsedající: Milan Kodíček, Václav Pačes

8:30 O102
Pačes V.: **Biochemie a středoškolská odborná činnost – vyhodnocení posterů**

9:15 O103
Kodíček M.: **O čem je současná biochemie?**

9:45 Informace o SOČ sekci na kongresu FEBS 2009 v Praze

Diskuse
Sponzorováno firmou KRD, s.r.o.

PROGRAM

Pathobiochemie / SÁL A

Předsedající: Pavel Martásek
(Symposium je věnováno prof. MUDr. Milanu Jirsovi, DrSc. k jeho nedožitým 85. narozeninám)

8:30 O104
Kraml J.: **Úvodní slovo a vzpomínka na prof. M. Jirsu**

8:40 O105
Martásek P.: **Pathobiochemie tvorby hemu**

9:10 O106
Jirsa M.: **Familární hyperbilirubinemie**

9:40 O107
Vítek L.: **Protektivní účinky produktů katabolické dráhy hemu**

10:10 – 10:30 ***Přestávka***

10:30 O108
Kotyza J., Havel D., Pešek M.: **Exprese metaloproteinasy 9 (gelatinasy B) u zánětu a nádorové proliferace**

11:00 O109
Powell L.W.: **Heamochromatosis – a 2008 update**

11:30 O110
Marohnic C.C.: **Diseases of flavoprotein oxidoreductase deficiency**

12:10 -13:00 **Plenární přednáška / SÁL A**
Předsedající: Ján Turňa

Gabriela Bukovská:
The analysis of bacteriophage BFK20 genome

Oběd

14:00 – 17:30 **Jednání v sekcích:**

Bioinformatika / SÁL B

Předsedající: Jan Pačes, Vojtěch Spiwok

14:00 O111
Strnad H., Vlček Č., Pačes J., Ulbrich P., Kolář M., Lapidus A., Maltsev N., Kogan Y., Kumar V., Fonstein M., Pačes V., Haselkorn R.: **Kompletní genomová sekvence bakterie Rhodobacter capsulatus SB1003**

14:30 O112
Kolář M., Pánek J., Vomastek T., Stodůlková E., Flieger M.: **Antigenní peptidy prezentované HLA-B2705 molekulou jsou generovány vyštěpením z proteinů v oblasti s charakteristickými strukturními vlastnostmi**

15:00 O113
Zelinka I., Lexa M., Snášel V.: **Umělá inteligence a prostředí Mathematica v bioinformatice**

15:30 ***Přestávka***

16:00 O114
Bystrý V., Lexa M.: **Systém pro odhad entropie a detekci struktury v proteinových sekvencích**

16:30 O115
Spiwok V., Tvaroška I.: **Molekulární modelování pomocí metadynamiky**

17:00 O116
Lexa M., Martínek T.: **Prohledávání genomových sekvencí s podporou v hardware**

Proteomika / SÁL D

Předsedající: Ludovít Škultéty, Karel Bezouška

14:00 O116A
Vítězka Ceny Arnolda Beckmana:
Skalníková H. (*ÚFGHZ AV ČR, Liběchov*): **Studium diferenciace nervových kmenových buněk pomocí proteomických metod**

14:30 O117
Pompach P., Novák P., Man P, Nedvěd J., Vladimír Havlíček, Dzubák P., Hajdúch M.: **Kvantifikace proteinové exprese u CEM buněk v průběhu protinádorové terapie akutní T lymfoblastické leukémie**

15:00 O118
Selicharová I., Smutná K., Šanda M., Matoušková E., Coufal D., Vydra J.: **Proteom buněk odvozených z metastazujících a nemetastazujících nádorů prsu; hledání nových prognostických faktorů**

15:30 – 16:00 ***Přestávka***

16:00 O119
Škultéty L., Hernychová L.Flores-Ramirez G., Toman R.: **Detekce a identifikace *Coxiella burneti* a faktorů její virulence (Detection and identification of Coxiella burnetii biomarkers and/or factors of virulence)**

16:30 O120
Vaněk O., Bezouška K.: **Využití analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-I v biochemii a proteomice**

17:00 O121
Hubálek M., Udržalová J., Netušilová K., Hernychová L., Marušová P., Dřevínek M.: **Bakteriální identifikace pomocí proteomických metod**

PROGRAM

Bioanalytické metody / SÁL C

Předsedající: Petr Skládal, Viktor Víglaský

14:00 Skládal P.: Úvodní slovo

14:05 O122
Fránek M.: **Biological recognition elements for bioanalytical systeme**

14:30 O123
Vítková M., Polák J., Klimčáková E., Kováčiková M., Kováčová Z., Vrzalová J., Rossmeislová L., Hněvkovská Z., Štich V.: **Aplikace mikrodialýzy pro měření cytokinů v tukové tkáni u obesních jedinců**

14:55 O124
Víglaský V., Bauer L., Tlučková K., Walko M.: **Bioanalytical analysis and thermodynamic evaluation of G-quadruplex DNA structures**

15:20 – 15:40 ***Přestávka***

15:40 O125
Skládal P.: **Imunosensory pro detekci patogenních mikroorganismů**

16:10 O126
Štys D., Urban J., Vaněk J., Soukup J.: **Metabolite profiling from the viewpoint of stochastic systems theory: the tool for realistic data evaluation**

16:35 O127
Kennedy M., Wildgoose J., McKena T., Hughes Ch., Giles K., Pringel S., Campuzano I., Langbride J., H. Bateman R.: **The utility of coupling ion mobility and oaTOF mass spectrometry**

17:05 O128
Duretz B.: **LC/MS in clinical and toxicological analysis: (i) A Complete General Unknown Screening Workflow for Analysis of Drugs and Toxic Compounds (ii) Routine Quantitative analyses of target Drugs or Endogenous Clinical markers**

Závěr sjezdu

POSTERY – ČÁST 1

14. 9. od 12:00 – 16. 9. do 10:00

Molekulární imunologie
Xenobiochemie
Rostlinná biochemie a molekulární biologie
Molekulární a buněčná biologie I. + II.
Proteiny a peptidy
Biochemie nádorů
Viry, bakterie a paraziti
SOČ postery

Molekulární imunologie

P1
Antalíková J., Jankovičová J., Simon M., Horovská Ľ., Fábryová K.: **Different isoforms of CD46 expressed on bovine spermatozoa, male and female genitals**

P2
Horovská Ľ., Simon M., Fábryová K., Antalíková J., Jankovičová J., Chrenek P.,Tančin V.: **Krížová reaktivita monoklonových protilátok detegujúcich CD molekuly hovädzieho dobytka s bunkami králika**

P3
Jankovičová J., Antalíková J., Simon M., Horovská Ľ., Fábryová K.: **Erytrocyte isoform of CD46 protein as a regulator of bovine complement activity**

P4
Fábryová K. Antalíková J., Jankovičová J., Simon M., Horovská Ľ.:
Biochemická charakterizácia býčieho spermiového antigén pomocou monoklonovej protilátky IVA -543

P5
Zachová K., Křupka M., Běláková J., Horynová M., Raška M.:
Příprava fúzních antigenů vyvolávajících specifickou buněčnou imunitní odpověď

Xenobiochemie

P7
Pavelka S.: **Effects of antidepressant fluoxetine (prozac-tm) on the metabolism of thyroid hormones**

P8
Miko M., Jantova S. and Konarikova K.: **Are the biological membranes site of action of new class of pyridinedicarboxylate Cu (II) complexes?**

P9
Jantová S., Brezová V., Miko M., Koňariková K., Vrecková Z., Milata V.: **Phototoxic effect and photochemical properties of ethyl 1,4-dihydro-8-nitro-4-oxoquinoline-3-carboxylate**

PROGRAM

P10
Bučková M., Godočíková J., Zámocký M., Polek B.: **Bacterial isolates from polluted environment exhibiting catalase and peroxidase activity**

P11
Brtko J., Eybl V.: **Úloha izoforiem selenoenzýmu jódtyronídejodázy v mechanizme účinku 3,5,3´- trijód – L – tyronín na úrovni bunky: vplyv vybraných endogénnych a exogénnych faktorov na aktivitu enzýmu**

P12
Šereš M., Poláková E., Križanová O., Šírová M., Breier A., Sulová Z.: **Overexpresia P-glykoproteínu v L1210/VCR je asociovaná so zmenami endoplazmatického retikula**

P13
Zatloukalová J., Machala M., Vondráček J.: **Modulation of cadherin- and catenin-mediated intercellular junctions by toxic AhR ligands**

P14
Moserová M., Arlt V. M., Phillips D. H., V. Kotrbová V., Henderson C. J., Frei E., Stiborová M.: **Role of cytochromes P450 in metabolic activation of benzo[a]pyrene and ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse**

P15
Mrázová B., Kotrbová V., Marešová M., Martínek V., Martínková M., Frei E. and Stiborová M.: **Preparation of apo-cytochrome b5 utilizing different methods and approaches**

P16
Kotrbová V., Mrázová B., Háčková M., Frei E. and Stiborová M.: **Modulation of CYP1A1/2-mediated biotransformation of anticancer drug ellipticine by cytochrome b5**

P17
Aimova D., Poljakova J., Frei E., Stiborova M.: **Ellipticine induces cytochromes P450 1A1, 1B1 and 3A in target and non-target tissues**

P18
Šístková J., Frei E., Schmeiser H.H., Stiborová M.: **Role of cytochrome P450 in detoxication of carcinogenic aristolochic acid**

P19
Svobodová M., Dračínská H.,Martínková M.,Frei E., Stiborová M.: **Oxidation of carcinogenic 2-nitroanisole and it´s metabolite 2-nitrophenol by cytochromes P450**

P20
Mizerovská J.,Dračínská H., Arlt V.M., Schmeiser H.H., Frei E., Stiborová M.: **Cytochromes P450 and peroxidases oxidize 3-aminobenzanthrone, the human metabolite of carcinogenic 3-nitrobenzanthrone**

P21
Poljaková J., Hřebačková J., Hraběta J., Eckschlager T., Frei E., Stiborová M.: **Study on mechanism of action of ellipticine on neuroblastoma cells**

P22
Živná L., Škarydová L., Wsól V.: **Diet flavonoids inhibit specific aldo-keto reductase AKR1C3**

PROGRAM

P23
Szotáková B., Lamka J., Dokoupilová I., Hradecká A., Skálová L.: **Import antihelmintik a jejich vliv na aktivitu biotransformačních enzymů motolice kopinaté**

P24
Pěnčíková K., Slavík J., Vondráček J., Machala M. : **Modulace hladin ceramidu a sfingomyelinu v jaterních epiteliálních buňkách potkana po expozici 2,3,7,8 – tetrachlordibenzo – p – dioxinem a 2,2´,4,4´, 5,5´- hexachlorbifenylem**

P25
Vykopalová L., Pěnčíková K., Ciganek M., Neča J., Vondráček J., Brack W., Luebcke-Von Varel U., Machala M.: **Identifikace toxických kontaminantů prostředí in vitro biotesty, LC-MS/MS a GC/MS**

P26
Umannová L., Krčmář P., Machala M., Kozubík A., Vondráček J.: **Alveolar type II epithelial cells as a model for studying genotoxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons under proinflammatory conditions**

P27
Krupková L., Olejníková P., Ondrušová Z., Kaliňáková B., Hudecová D.: **Biological activity of new fenamates with metal ion in the molecule**

P28
Křížová V., Lamka J., Kubíček V., Škrtelová M.,Szotáková B., Skálová L.: **Aktivity biotransformačních enzymů vlasovek izolovaných z ovcí léčených subterapeutickými dávkami flubendazolu**

P29
Trilecová L., Marvanová S., Pěnčíková K., Krčmář P., Topinka J., Vondráček J., Machala M.: **Genotoxické a nádorově promoční účinky metylovaných benzo[a]pyrenů v jaterních epiteliálních buňkách potkana**

P30
Hrubá E., Trilecová L., Marvanová S., Topinka J., Souček K., Vondráček J., Machala M.: **Buněčný cyklus a apoptáza v buňkách adenokarcinomu prostaty LNCaP exponovaných genotoxickými polycyklickými aromatickými uhlovodíky**

P31
Škarydová L., Živná L., Hubálek M., Wsól V.: **Ion-exchange chromatography as a tool for purification of membrane-bound carbonyl reductases**

P32
Šimečková P., Zatloukalová J., Paděrová V., Krčmář P., Andrysík Z., Vondráček J., Machala M.: **Interakce 2,2´,4,4´,5,5´-hexachlórbifenylu (PCB 153) s membránově vázanými proteiny mezibuněčných spojení in vitro**

P33
Uhnáková B., Martínková M., Petříčková A., Rázga M., Homolka L.: **Biodegradácia bromovaných derivátov fenolu**

P34
Petříčková A., Uhnáková B., Vejvoda V., Rázga M., Homolka L., Martínková L.: **Biodegradace bromovaných aromatických látek**

PROGRAM

P35
Vantová Z., Paulíková H., Hudecová D., Kožurková M., Sabolová D., Dovinova I., Kristián P., Imrich M., Ungvarský J. Janovec L.: **Evaluation of cytotoxicity of new DNA-intercalators 2´,2´´-[(acridine-3,6-diyl) diimino]-1,3-diimidazolidine-4-one derivatives.**

P36
Boháčová V., Barančík M., Dočolomanský P., Breier A.: **The mechanism involved in the effects of pentoxifylline on the P-glycoprotein – mediated multidrug resistance in L1210/VCR cells**

P37
Dočolomanský P., Boháčová V., Barančík M.: **Really interact derivatives of PTX with P-glycoprotein at the drugs binding site?**

P38
Sulova Z., Macejova D., Seres M., Sedlak J., Brtko J., Breier A.: **Zapojenie receptorov pre retinoidy de regulácie expresie a transportnej aktivity P – glykoproteínu**

P39
Špániková A., Ivanová M., Matejíková J., Ravingerová T., Barančík M.: **Influence of ischemia/reperfusion and modulation of PI3K/AKT kinase pathway on matrix metalloproteinases activities in rat hearts**

P40
Barančík M., Boháčová V., Sulová Z., Sedlák J., Breier A.: **The effects of protein kinases inhibitors on P – glycoprotein – mediated multidrug resistance in L1210/VCR cells**

P41
Gibalová L., Sedlák J., Hulíková B., Breier A., Barančík M., Sulová Z.: **Vplyv overexpresie P – glykoproteínu na indukciu apoptózy s cisplatinou v L1210 bunkách**

P42
Zidek V. , Zidkova J., Kontrova K., Sajdok J., Szabova K., Fucikova A., Szakova J., Tlustos P., Sestakova I., Pravenec M.: **Analysis of the impact of cadmium on the level of hepatic metallothioneins and selected enzymes in experimental rat model**

P43
Líbalová H., Merkerová M., Kráčmarová A., Topinka J., Rössner P., Milcová A., Brdička R., Stránecký V., Ivánek R., Balaščák I., Šrám R.J.: **Využití toxikogenomiky při studiu mechanismů působení cizorodých látek v životním prostředí na lidské zdraví**

P43A
Paulíková H., Vantová Z., Keltošová S., Kožurková M., Sabolová D., Kristián P., Imrich M., Janovec L..: **Novel metyl-2-[2-(acridine-9-ylimino)-4-oxo-1,3-tiazolan-5-yliden] derivatives as DNA intercalators and glutathione modulators with antitumour activity**

Rostlinná biochemie a molekulární biologie

P44
Vyroubalová Š., Galuszka P., Ohnoutková L.: **Transgenic barley (Hordeum vulgare L.) with enhanced expression of cytokinin dehydrogenase gene**

P45
Herbstová M., Prášil O.,Vácha F.: **Localisation of Pcb antennae complexes in Prochlorothrix hollandica under various growing conditions**

P46
Luhová L., Vaníčková P., Piterková J., Navrátilová B. and Petřivalský M.: **The role of nitric oxide during regeneration of cucumber cells from protoplast suspension**

P47
Gardian Z., Vácha F.: **Electron microscopy in structural characterization of Photosystem I and Photosystem II complexes from chromophytic alga Xanthonema debile.**

P48
Šmehilová M., Galuszka P., Kowalska M., Bilyeu K. D., Frébort I.: **Apoplastic and non-secreted cytokinin dehydrogenase from maize: homology and diversity**

P49
Kamlar M. [1,2], Uhlík O. [1,2], Šanda M. [1], Kohout L. [1] a Macek T. [1]: **RuBisCO jako bílkovina s afinitou k rostlinným brassinosteroidům, látkám s hormonální aktivitou**

P50
Stránská J., Snégaroff J., Tylichová M., Kopečný D., Šebela M.: **Cloning and Expression of Plant Ornithine Delta-Aminotransferase**

P51
Svozilová Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J.: **Interakce cryptogeinu s vazebným místem na plasmatické membráně tabáku**

P52
Piterková J., Matulková Z., Luhová L., Petřivalský M., Mieslerová B., Lebeda A.:
The comparison of the development of Oidium neolycopersici on the leaf and leaf discs of Lycopersicon spp. exposed to heat and cold shock pre-treatment

P53
Klímová M., Šašek V., Burketová L., Martinec J.: **Elicitační účinek hydrolyzátů kolagenu a extraktů z dubové kůry a zázvoru na buněčné kultury tabáku a Arabidopsis thaliana**

P54
Pejchar P., Novotná Z., Schwarzerová K., Valentová O., Martinec J.: **Ionty hlinité způsobují rychlý pokles hladiny diacylglycerolu v rostlinných buňkách**

P55
Kučera T., Herbstová M., Šonská A.: **Oligomeric state of photosystem 2 studied by radiation deactivation and native electrophoresis**

P56
Kučera T., Fendrychová A.: **Changes in pigment composition of thylakoid membranes in the presence of cadmium ions**

P57
Durchan M., Fuciman M., Herbstová M., Vácha F., Polívka T.: **Time-resolved absorption of the isolated Pcb protein, and the Pcb-Photosystem I supercomplex from Prochlorothrix hollandica**

P58
Kopečný D., Popelková H., Madzak C., Briozzo P., Šebela M., Frébort I., Majira A., Laloue M., Houba-Hérin N.: **Site-directed mutagenesis of maize cytokinin oxidase/dehydrogenase**

P59
Doubnerová V., Potůčková L., Ryšlavá H.: **NADP – malic enzyme from tobacco leaves: kinetics and regulation**

P60
Ryšlavá H., Doubnerová V., Müller K., Čeřovská N.: **Changes in expression and activity of PEPC and NADP-ME in plants infected with Potato virus Y.**

P61
Jirsa O., Martinek P. , Večerková L., Bucher P., Bartáčková V., Hajšlová J.: **Vliv pražení na obsah akrylamidu v obilovinách a sladech**

P62
Wiesner I., Wiesnerová D., Demelová B., and Třasáková J.: **Isolation, sequencing, and genetic diversity of microsatellite loci from Begonia x tuberhybrida Voss. germplasm.**

P63
Müller K., El Ansary H.O., Štorchová H.: **Study of the transcription variability of mitochondrial genes in Silene vulgaris**

Molekulární a buněčná biologie I. + II.

P64
Kalousek I., Brodská B., Otevřelová P.: **Expression of apoptosis related genes in human peripheral blood lymphocytes treated with suberoyl anilide hydroxamic acid**

P65
Kutaš P., Nováková R., Fecková L., Bistáková J., Kormanec J.: **Characterization of gene cluster for polyketide antibiotic auricin in Streptomyces aureofaciens CCM3239.**

P66
Ševčíková B., Mazuráková V., Kormanec J.: **Link between regulation of two stress response sigma factors SigH and SigB in Streptomyces coelicolor.**

P67
Fecková L., Nováková R., Kutaš P., Kormanec J.: **The genes encoding gama-butyrolactone autoregulator-receptor system in Streptomyces aureofaciens CM3239.**

P68
Homerova D., Kormanec J.: **Identification of promoters recognized by RNA polymerase containing Staphylococcus aureus sigma factor SigH and transcriptional characterization of sigH operon**

P69
Lajdová I., Spustová V., Okša A., Chorvátová A., Chorvát D. Jr., Štefíková K., Dzúrik R.: **Intracellular calcium balance in chronic kidney disease patients: effect of vitamin D supplementation**

P70
Kočí L., Hýžďalová M., Vaculová A., Hofmanová J., Kozubík A.: **Differences in TRAIL-induced apoptosis during adherent and nonadherent cultivation**

P71
Švéda M., Knejzlík Z., Ruml T.: **Studium funkce proteinu UBL5 v buňce**

P72
Hlinková V., Hostinová E., Gašperík J., Borko L., Zahradníková A. and Ševčík J.: **Cloning, expression, purification and crystallization of domains of human ryanodine receptor**

P73
Šmidák R., Královičová M., Jopčík M., Nováková R., Fecková L`, Ševčíková B., Kormanec J., Timko J., Turňa J.: **Genomic and Expression Analysis of Penicillin Biosynthetic Genes from New Highly Producing Strains of Penicillium chrysogenum**

P74
Kušnierová P., Stejskal D., Ochmanová R.: **Frekvence mutací v genech účastnících se metabolismu triglyceridů v kontextu s léčbou hypertriglyceridémie jako rizikového faktoru komplikací aterosklerózy**

P75
Balková K., Hodúrová Z., Gbelská Y.: **KIPDR1 is required for multidrug resistance in kluyveromyces lactis**

P76
Landová M., Knejzlík Z., Ruml T.: **Biochemický důkaz interakce proteinu UBC9 a integrasy viru lidské imunodeficience**

P77
Blanářová O., Jelínková I., Jendželovský R., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kozubík A.: **Novel platinum(IV) complex LA-12 induces cell cycle phase specific apoptosis in colon carcinoma cell line HCT116**

P78
Kamanova J., Kofronova O., Masin J., Genth H., Vojtova J., Linhartova I., Benada O., Just I., and Sebo P.: **Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling**

P79
Valkovičová L., Alekhina O., Valková D., Turňa J.: **Molecular studies of the ter operon genes involved in the tellurite resistance present in uropathogenic Escherichia coli**

P80
Odnogová Z., Grones P., Gičová A., Marhavý P., Grones J.: **Molekulárna identifikácia octových baktérií a charakterizácia plazmidu pGP2**

P81
Jelínková I., Blanářová O., Hofmanová J., Sova P., Kozubík A.: **Effect of platinum(IV) complex LA-12 on expression of receptors for trail in human colon carcinoma cells**

P82
Kubálková, J., Kassayová, M., Orendáš, P., Ahlers, I., Bojková, B., Mareková M.: **DNA damage in rat peripheral blood lymphocytes after induction of mammary carcinogenesis: effect of melatonin treatment**

P83
Halgašová N., Grácová A., Timko J., Bukovská G.: **Expression, purification, and characterization of recombinant DNA helicase from corynephage BFK20.**

P84
Gerová M., Halgašová N., Ugorčáková J., Bukovská G.: **Molecular Characterization and Biochemical Analysis of Bacteriophage BFK20 Lytic protein**

P85
Júdová, J., Šak, D.: **The lead influence on the individuals of crustaceans in high mountain environment**

P86
Bryndzová L., Huntošová V., Mateášik A., Naďová Z., Sureau F., MiškovskýP.: **Efektívnosť záchytu a vnútrobunková distribúcia fotoaktívnych molekúl (hypericínu) závisí od použitého transportného systému**

P87
Halbhuber Z., Onderková H.: **Alexa Fluor® Dyes – microarray labeling you can trust**

P87A
Ugorčáková J., Bukovská G., Hlavatý T.*, Timko J.: **Detection of point mutations in *Ras* oncogene by Real-Time PCR-based genotyping assay**

Peptidy a proteiny

P88
Davidová A., Kubáč D., Vejvoda V., Martínková L.: **Purifikace nitrilas produkovaných vláknitými houbami Fusarium solani a Penicillium multicolor**

P89
Gazova Z., Bellova A., Imrich J., Kristian P., Daxnerova Z., Antalik M., Fedunova D., Bagelova J.: **Acridines – effective inhibitors of amyloid aggregation**

P90
Bágeľová J., Fedunová D., Gažová Z., Fabian M., Antalík M.: **Conformational transitions of cytochrome c in the presence of sorbitol and NaCl**

P91
Blahovec J., Kostecká Z., Kočišová A.: **Soybean protease inhibitors influence growth, development and enzyme activity of proteases of housefly larvae of Musca domestica**

P92
Fedunová D., Bánó M., Bágeľová J., Gažová Z., Antalík M.: **Viscometric method as novel approach for detection of thermally induced protein aggregation**

P93
Očenášová A., Dobrota D., Galajda P.: **Vplyv leptínu, grelínu a adiponektínu na metabolický syndróm**

P94
Staněk O., Šimšová M., Šebo P.: **Příprava, purifikace a charakterizace nativního komplexu CFP-10/ESAT-6**

P95
Šimkovič M., Kurucová A., Varečka Ľ.: **Secretion of extracellular proteases from filamentous fungi: nutrition vs. recognition**

P96
Bílahorková A., Orctová L.,Matoušek J.,Lipovová P., Králová B.: **Izolace a charakterizace nukleasy z pylu borovice černé, stanovení jejího protinádorového účinku in vitro**

P97
Škopek, J., Matoušek, J.: **Vliv malonyl-3'-defosfo-CoA na kinetiku in vitro enzymových reakcí katalyzovaných chmelovými chalkonsyntázovými homology chs_H1, chs2, chs4 a vps**

P97A
Hlaváček J., Bennettová B., Slaninová J., Černý B., Vlasáková V., Holík D., Tykva R.: **Oostatic peptides containing D-amino acids: Activity and degradation in the flesh fly *Neobellieria bullata***

Biochemie nádorů

P98
Moravčíková E., Křepela E., Procházka J., Čermák J., Benková K.: **Malfunction of apoptosome pathway in non-small cell lung cancer cells**

P99
Žbodáková O., Křepela E., Procházka J., Čermák J., Benková K.: **Expression of DNA fragmentation factor subunits in lung cancer cells and tissues**

P100
Skender B., Hýžďalová M., Vaculová A., Kozubík A., Hofmanová J.: **Modulation of the effects of apoptotic inductors from the TNF family by dietary lipid components**

P101
Ehrlichova M., Vaclavikova R., Horsky S., Mandys V., Gut I.: **Transport of classical and novel taxanes in human cancer cells and in tumors of mammary gland**

P102
Hubackova M., Vaclavikova R., Kodet R., Mrhalova M., Kubackova K., Gut I., Soucek P.: **Superoxide dismutase 2 expression co-segregates with prognosis of breast cancer patients**

P103
Roušalová I., Křepela E., Procházka J., Čermák J., Benková K.: **Expression of proteinase inhibitor-9 in non-small cell lung carcinoma: effect of estradiol-17beta and interleukins**

P104
Tomandl J., Salzman R., Tóthová E., Pácal L., Kaňková K., Kostřica R.: **Malondialdehyde as a prognostic parameter in squamous cell carcinoma of oral cavity and oropharynx**

Viry, bakterie, paraziti: struktura a funkce jejich molekul

P105
Osička R., Morová J., Osičková A., Mašín J. and Šebo P.: **Interaction of Bordetella adenylate cyclase toxin with the integrin CD11b/CD18**

P106
Horáčková, J., Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L.: **Identification of the genes for ML-domain containing protein, Der-p2-like allergen and tick receptor for OspA in hard tick Ixodes ricinus: their role in vector-pathogen interaction**

P107
Matějovská T., Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.: **Tick(s) defense proteins: similarity, site of expression and stage-specific expression**

P108
Krajcikova D., Lukacova M., Mullerova D., Barak I.: **Searching for protein-protein interactions among the Bacillus subtilis spore coat proteins.**

P109
Dorňáková V., Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.: **Ricinusin – nový antimikrobiální peptid z klíštěte Ixodes ricinus:třetí člen rodiny klíštěcích obranných peptidů bohatých na histidin**

P110
Stropkovská A., Fislová T., Kostolanský F., Varečková E.: **Imunitná odpoveď myší po expozícii vtáčiemu vírusu chrípky bez jeho predchádzajúcej medzidruhovej adaptácie**

P111
Staneková Z., Janulíková J., Fislová T., Mucha V., Kostolanský F., Varečková E.: **Epitopová špecifita protilátkovej odpovede indukovanej ľahkým reťazcom hemaglutinínu vírusu chrípky počas chrípkovej infekcie ľudí.**

P112
Burešová V., Hajdušek O., Franta Z., Sojka D., Kopáček P.: **Immune function of alpha-2-macroglobulin (IrAM) in the hemolymph of the hard tick Ixodes ricinus**

P113
Košík I., Krejnusová I., Bystrická M., Russ G.: **Sledovanie expresie mRNA génu NS1 ako infekčného markera vírusu chrípky typu A**

P114
Krejnusová I., Bystrická M., Russ G.: **Pasívna imunizácia myší s protilátkami špecifickými pre PB1-F2 proteín vírusu chrípky typu A**

P115
Dupejová J., Štěrba J., Vancová M., Kovář V., Grubhoffer L.: **Fibrinogen-related proteins (lectins) in tick Dermacentor marginatus hemolymph**

P116
Benkovičová V., Horváth A., Verner, Z.: **Číslo 2 v dýchacom reťazci trypanozomatíd**

PROGRAM

P117
Farkašovská J., Brnáková Z., Godány A.: **Functional analysis of the lysis genes of Streptomyces aureofaciens phage μ1/6 in homologous and heterologous host cells**

P118
Voráčková I., Ulbrich P., Ruml T.: **Terapeutické využití pseudovirových částic**

P119
Chmelař J., Kotsyfakis M., Kopecký J.: **Structural and functional description of the four serpins from the tick ixodes ricinus**

P120
Horn M., Zikmundova-Nussbaumerova M., Sanda M., Franta Z., Sojka D., Kovarova Z., Srba J., Kopacek P., Mares M.: **Hemoglobin proteolysis in blood-feeding ticks: mapping of multienzyme cascade by functional proteomics**

P121
Grznárová P., Lipov J., Ruml T.: **Intracelulární transport polyproteinu Gag Mason-Pfizerova opičího viru**

P122
Havlíková S., Roller L., Kazimírová M., Labuda M.: **Differential gene expression of salivary gland proteins in Ixodes ricinus**

P123
Peterková K., Koči J., Roller L., Kazimírová M., Slovák M., Hajnická V.: **p36 gene expression in salivary glands of Amblyomma variegatum and Dermacentor reticulatus ticks.**

P124
Benkovičová V., Verner Z., Horváth A.: **Číslo 2 v dýchacom reťazci trypanozomatíd**

P125
Drahovská H., Szemes T., Šoltýsová A., Tóthová Ľ., Al-Alami H., Turňa J.: **Genetic variability of prophages from salmonella strains**

P126
Halásová Z., Valovičová M., Belvončíková P., Mačáková-Reinhardt K., Kúdelová M.: **Evidence of gene sequence variability among Murine gammaherpesvirus (MHV) strains 72 and 4556**

P127
Sedláček, V., Kučera, I.: **FerA from Paracoccus denitrificans participates in iron utilization**

P127A
Prchal J., Doležal M., Vlach J., Lipov J., Rumlová M., Hrabal R., Ruml T.: **Strukturní a funkční studie mutantů T41I/T78I a Y28F/Y67F matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru**

P127B
Bumba L., Masin J., Fiser R., Sebo P.: **Lipid rafts serves as platform for translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin**

POSTERY – ČÁST 2

16. 9. od 12:00 – 17. 9. do 18:00

Bioenergetika
Proteinové inženýrství a biotechnologie
Volné radikály v biochemii
Biochemie lipidů a membrán
Glykobiochemie
Pathobiochemie
SOČ – postery budou vystaveny po celou dobu sjezdu
Proteomika
Bioanalytické metody

Bioenergetika

P128
Zeman, I., Jánošíková, E., Nosek, J.: **Characterization of mitochondrial carriers from Candida parapsilosis**

P129
Wenchich L., Hansíková H., Knoppová S., Zeman J.: **Polarographic evaluation of mitochondrial functions in permeabilized muscle cells in patients with suspected mitochondrial defects**

P130
Řezníčková J., Nováková Z., Majerník A., Šmigáň P.: **Vplyv niektorých statínov a antimykotík na Methanothermobacter thermautotrophicus**

P131
Ondrovičová G., Fričová D.,Hlinková V.,Ambro Ľ., Adamušková H., Kutejová E., Nosek J.: **The mitochondrial lon protease as DNA binding protein**

P132
Majerník A., Nováková Z., Šurín S., Šmigáň P.: **Štúdium bioenergetických mutantov methanoarchaea kombináciou genomického, proteomického a sekvenačného prístu**pu

P133
Nováková Z., Majerník A., Šmigáň P.: **Mechanisms of resistance to pharmaceutical drugs and biocides in Methanothermobacter thermautotrophicus**

P134
Kovářová N., Pecina P., Dell'Agnello C., Zeviani M., Houštěk J.: **Charakterizace respiračních superkomplexů v různých typech savčích mitochondrií**

P135
Hejzlarová K., Ješina P., Kaplanová V., Drahota Z., Kalous M., Houštěk J.: **Heteroplazmie mutace 9205delTA v ATP6 genu mitochondriální DNA a porucha funkce mitochondriální ATP syntázy**

P136
Nůsková H., Pecina P., Drahota Z., Houštěk J.: **Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by pyruvate (Obnova aktivity cytochrom c oxidázy inhibované kyanidem prostřednictvím pyruvátu)**

P137
Havlíčková V., Čížková A., Paul J., Kaplanová V., Tesařová M., Zeman J., Kmoch S.: **Genetický původ a komplementační studie izolovaného defektu mitochondriální ATP syntázy**

Proteinové inženýrství a biotechnologie

P138
Luňáčková T., Lipovová P., Benešová E., Králová B.: **Vliv modifikací na katalytickou aktivitu chladově aktivní beta-D-galaktosidasy z Arthrobacter sp. C2-2**

P139
Karelová E., Harichová J., Ferianc P.: **The fates of culturable bacteria in heavy-metal-contaminated soil**

P140
Kowalska M., Šmehilová M., Galuszka P., Frébort I.: **Expression of arabidopsis thaliana vacuolar cytokinin oxidase/dehydrogenases in pichia pastoris**

P141
Kaplan O., Martínková L., Kavan D., Bezouška K., Vejvoda V., Plíhal O., Benada O., Pompach P., Vaněk O. a Kumar V.: **Heterologní exprese nitrilasy z Aspergillus niger K10**

P142
Malandra A., Martínková L., Cantarella M., Kaplan O., Vejvoda V., Štěpánková B., Kubáč D.: **Operational stability of fungal nitrilases in continuous stirred membrane reactors**

P143
Blažek J., Riedl J., Lipovová P., Holý A., Králová B.: **Vliv struktury akceptoru a reakčních podmínek na výtěžek galaktosylace**

P144
Purkrtová Z., Králová B., Verstraete W., Sabirova J.: **Vliv vápenatých iontů na akumulaci lipidů v mořské bakterii Alcanivorax borkumensis**

P145
Podzimek T., Matousek J., Lipovová P.: **Porovnání vlastností tří rostlinných nukleas s potenciálním protinádorovým účinkem**

P146
Vejvoda V., Šveda O., Rinágelová A., Křen V., Martínková L.: **Nové metody pro stanovení aktivity nitrilas**

P147
Kyselá H., Orság P., Ševčík M.: **Optimalizace transientní transfekce buněčné linie HEK 293 v bezsérovém médiu**

PROGRAM

Volné radikály v biochemii

P148
Babusikova E., Hatok J., Jesenak M., Dobrota D., Kaplan P.: **Protein and lipid oxidative damage in brain and heart with advancing age**

P149
Purchartová K., Gažák R., Křen V.: **Antioxidační vlastnosti esterů silybinu s mastnými kyselinami**

P150
Dávidová A., Schreiberová A., Kolesár D., Maršala J., Lukáčová N.: **The effect of peripheral nerve injury on the level of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord**

P151
Šmídová Z., Izzo R.: **Influence of salt stress on tomatoes**

P152
Országhová Z., Liptáková A., Žitňanová I., Watala C., Muchová J., Ďuračková Z.: **Štúdium účinku metylnikotínamidu na markery oxidačného stresu u potkanov s diabetes mellitus indukovaným streptozotocínom**

P153
Skoumalová A., Wilhelm J.: **Ochranná úloha hyperkapnie před radikálovým poškozením**

Biochemie lipidů a membrán

P154
Pravenec M., Zídek V., Landa V., Mlejnek P., Kazdová L., Viklický O., Kurtz T.W.: **Genetická deficience v renální expresi Cd36 zvyšuje krevní tlak u spontánně hypertenzních potkanů**

P155
Staňková B., Tvrzická E., Krátká J., Vecka M., Žák A.: **Mastné kyseliny v dietních doplňcích**

P156
Macášek J., Tvrzická E., Staňková B., Vecka M., Žák A.: **Změny ve složení mastných kyselin v lipoproteinech u různých poruch výživy**

P157
Šemberová L., Seydlová G., Halada P., Svobodová J.: **Časná odpověď Bacillus subtilis na etanolový stres**

P158
Obernauerová M., Polakovičová V., Tichá E.: **Anionické fosfolipidy v biogenéze mitochondrií Kluyveromyces lactis**

P159
Malínská H., Maxová M., Hubová M., Kazdová L.: **Antiadipogenní účinky konjugované kyseliny linolové u experimentálního modelu metabolického syndromu**

P160
Janovska P., Kus V., Jilkova Z., Matejckova E., Cerhakova J., Rossmeisl M., Kopecky J.: **Assessment of whole-body energy expenditure in mice by system INCA:methodological aspects**

P161
Poloncová K., Griač P.: **Identifikácia funkcie Sfh1 proteínu**

P162
Lakatoš B., Hudec R., Vaneková M., Varečka Ľ.: **Auxiliary mechanisms are involved in the activation of the Gárdos effect in human red blood cells**

Glykobiochemie

P163
Cabálková J., Čmelík R., Bobáľová J.: **Carbohydrate chemistry of congress wort, hopped wort and green beer**

P164
Komárek J., Malinovská L., Wimmerová M.: **Bioinformatické vyhledávání lektinů z hub a plísní**

P165
Drozdová A., Weignerová L., Křenek K., Křen V.: **Beta-N-Acetylhexosaminidasa z Aspergillus oryzae: produkce, purifikace a použití pro selektivní glykosylaci imunoaktivních látek**

P166
Kolenová K., de Vries R. P., Stalbrand H.: **Comparison of three Aspergillus nidulans beta-mannanases**

P167
Vancová M., Bučinská L., Štěrba J., Grubhoffer L.: **The presence of N-acetylneuraminic acid modified protein in salivary glands of ticks Ixodes ricinus**

P168
Beláňová M., Jackson M., Korduláková J., Mikušová K.: **Štúdium úlohy predpokladanej glykozyltransferázy MSMEG_2699 v procese biosyntézy bunkového obalu mykobaktérií**

P169
Chlubnová I., Nugier-Chauvin C., Daniellou R., Králová B., Ferri?res V.: **Chemo-enzymatic synthesis of bioactive furanosyl-containing glycoconjugates**

P170
Ďuranová M., de Vries R. P., Biely P.: **Purification of two Phanerochaete chrysosporium glucuronoyl esterases**

P171
Michálková K., Weignerová L., Křen V.: **Produkce a purifikace alfa-N-acetylgalaktosaminidasy a její použití pro glykosylace aminokyselin**

P172
Dianišková P., Korduláková J., Kaur D., Jackson M., Brennan P. J., Mikušová K.: **Preparation of the tools for investigation of the putative mycobacterial ABC transporter MSMEG_6366 – MSMEG_6369**

P173
Houser J., Daňková V., Wimmerová M.: **Aspergillus fumigatus lectins**

P174
Slámová K., Bojarová P., Křenek K., Gažák R., Bezouška K., Spencer J. W., Macková M., Křen V.: **Nepřirozené substráty beta-N-acetylhexosaminidas: syntéza nových imunoaktivních glykosidů**

P175
Benešová E., Lipovová P., Riedl J., Králová B.: **Alfa-L-Fukosidasová a beta-D-fukosidasová aktivita bakterie Paenibacillus thiaminolyticus**

Pathobiochemie

P176
Pavelka S.: **Interference of exogenous bromide with the metabolism of thyroid hormones in the rat**

P177
Kravčuková P., Gottlieb M., Matiašová M., Danielisová V., Némethová M., Burda J.: **Štúdium vplyvu glutamátu na DNA krvných lymfocytov po ischémii mozgu u potkana**

P178
Hatok J., Zubor P., Galo S., Kirschnerova R., Dobrota D., Racay P.: **Expression of aromatase mRNA in endometrium from women with and without endometriosis or adenomyosis**

P179
Ulbrichová D., Martásek P.: **Dopad mutací v genu pro porfobilinogen deaminázu na biochemické a enzymatické vlastnosti proteinů**

P180
Lukáčová N., Dávidová A., Kolesár D., Schreiberová A., Maršala J.: **The role of nitric oxide synthase in pathogenesis of spasticity**

P181
Mikula I., Durocher S., van Faassen E., Mutus B., Slama-Schwok A., Martásek P.: **Srovnání nitritreduktázové aktivity izoforem syntáz oxidu dusnatého při hypoxii**

P182
Pospíšilová L., Králík L., Brůha R., Mareček Z., Flachsová E., Frühauf P., Puchmajerová A., Zeman J., Martásek P.: **Mutační analýza genů ATP7A, ATP7B a ATOX1 u nemocných s Menkesovou chorobou a Wilsonovou chorobou v České republice**

P183
Schreiberova A., Kolesarova M., Kolesar D., Davidova A., Marsala J., Lukacova N.: **Calcium-dependent nitric oxide synthase activity in the spinal cord after transient ischemia/reperfusion**

P184
Hansíková H., Veselá K., Stibůrek L. and Zeman J.: **Tissue copper content in patients with mutations in cytochrome c oxidase assembly genes**

P185
Viktorínová, A., Trebatická, J., Chovanová, Z., Ursínyová, M., Uhnáková, I., Ďuračková, Z.: **Metabolizmus niektorých stopových prvkov u detí s ochorením Hyperkinetická porucha aktivity a pozornosti**

P186
Vozár I., Turecký L.,Vozár I.jr.: **Stanovenie asymetrického dimetylarginínu metódou plynovej chromatografie v sére**

P187
Barnincová L, Behúnová J, Martásek P.: **Dubin-Johnsonův a Gilbertův syndrom ve Slovenské populaci, první popis současné homozygozity**

P188
Krivošíková Z., Šustrová M., Spustová V., Štefíková K.: **Produkty pokročilej glykácie a oxidácie proteínov a usCRP u pacientov s Downovým syndrómom**

P189
Krivošíková Z., Krajčovičová-Kudláčková M., Spustová V., Štefíková K., Valachovičová M., Dzúrik R., Němcová T.: **Kostný metabolizmus u vegetariánok**

P190
Šustrová M., Krivošíková Z., Spustová V., Štefíková K.: **Vplyv hypogonadizmu na kostnú hustotu u mužov s Downovým syndrómom.**

P191
Boušová I., Bacílková E., Dršata J.: **Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal; effect of selected antioxidants**

SOČ – postery budou vystaveny po celou dobu sjezdu

P192 – Poster vyvěšen v sekci „Rostlinná biochemie a molekulární biologie“
Pospíšilová H., Novák O., Šebela M., Frébort I.: **Cloning, expression and characterization of eukaryotic adenine deaminases**

P193
Urbánková T.: **Role restrikční podjednotky HsdR u restrikčních enzymů typu I**

P194
Pech D.: **Izolace a klonování genu pro cystatin 1, inhibitor cysteinové proteázy klíštěte obecného Ixodes ricinus**

P195
Pešák L.: **Vitální analýza beněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie**

P196
Konvičková J. (Kopáček P. – vedoucí práce): **Dynamika aktivity trávicích enzymů klíštěte Ixodes ricinus v průběhu sání**

P197
Těsnohlídková L.: **Využití elektrochemické analýzy pro sledování modifikace nukleových kyselin platinovými cytostatiky**

P199
Rejzek Z., Střeleček T.: **Kantoři, nepropadejte panice aneb Interaktivní výuka biologie**

P200
Kunc P.: **Chemie, Laboratorní technika**

P201
Selinger M.: **Infekční systém pro studium mechanismů viroidní patogeneze**

Proteomika

P202
Mášová A., Šindelka, R. Šanda M., Jiráček J.: **Gene and protein expression responses in larvae of the fleshfly Sarcophaga bullata upon immune stimulation**

P203
Laštovičková M., Dyčka F., Bobálová J.: **Investigation of the matrix influence on the quality of maldi-tof mass spectra of intact proteins and glycoproteins**

P204
Mazanec K., Bobáľová J., Šlais K.: **Use of divergent flow isoelectric focusing for sample preparation in study of beer-related proteins**

P205
Tůma Z., Mareš J., Moravec J., Kroužecký A., Karvunidis T., Matějovič M.: **Characterization of proteins adsorbed to hemodialysis membrane in clinical setting**

P206
Grebeňová D., Pluskalová M., Kuželová K., Halada P., Pešlová K., Hrkal Z.: **Proteomic analysis of the cytoskeleton assembly in chronic myelogenous leukemia cells: effect of tyrosine-kinase inhibitor imatinib mesylate**

P207
Zajoncová L., Pečová M., Zbořil R. Šebela M.: **Immobilization of trypsin conjugates on paramagnetic nanoparticles for protein digestion**

P208
Vermachová M., Šantrůček J., Kodíček M.: **Povrchové mapování proteinů v oleosomech A.thaliana**

P209
Šalplachta J., Laštovičková M.: **Proteomic analysis of wheat prolamins in the presence of related proteins of rice and maize**

P210
Mládková J., Šanda M., Selicharová I.: **Comparison of expression of Glutathione S-transferases in cancer cell lines using affinity chromatography and 2-DE**

P211
Zeisbergerová M., Klimíčková A., Glatz Z.: **Využití elektroforeticky zprostředkované mikroanalýzy v proteomice pro on-line tryptické štěpení proteinů**

Bioanalytické metody

P212
Pavelka S.: **Radiometric determination of the iodothyronine deiodinases enzyme activities**

P213
Blažková M., Šmídová Z., Fukal L., Wichers J. H., Rauch P., van Amerongen A.: **Immunochromatographic tests for the detection of different types of analytes**

P214
Holubová B.: **The development of an immunochromatographic method for the determination of pesticide carbaryl**

P215
Šmídová Z., Blažková M., Rauch P., Fukal L.: **Comparison of immunochemical methods for detection of thiabendazole**

P216
Birková A., Dubayová K., Tichá M., Kušnír J.: **Profilové metódy pri získavaní informácií o patologických stavoch biologických systémov**

P217
Tichá M., Birková A., Dubayová K., Kušnír J.: **Multifluorescenčné modelové zmesi a ich využitie na analýzu niektorých biologických materiálov**

P218
Radvánský J., Minárik G., Kádaši Ľ.: **Detekcia jednonukleotidovej mutácie pomocou high-resolution melting analýzy s využitím farbičky EvaGreen**

P219
Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.:
The new HPLC method using monolithic technology for simultaneous determination of vitamin D2, D3 and 25(OH)D3 in human serum

P220
Krčmová L., Kalábová H., Kašparová M., Melichar B., Solichová D., Solich P., Macka M.:
Liquid chromatography and capillary electrophoresis for the monitoring of neopterin in cancer patients

P221
Petrovič V., Novotný J., Hisira V., Link R., Leng Ľ., Kováč G.: **The impact of suckling and post-weaning period on blood chemistry**

P222
Auinger F., Kůdela M., Tajbrová L., Smětáková M., Jančíková M., Zídková J., Pilin A.,
Sajdok J.: **Metodika stanovení délky telomer pro použití ve forensní medicíně.**

SBORNÍK PŘEDNÁŠEK A POSTERŮ

Seřazeno podle programu.

Texty abstrakt neprošly jazykovou ani redakční úpravou.

18:00

Václav Hořejší
Membránové mikrodomény a imunoreceptorová signalizace

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.
horejsi@biomed.cas.cz

Při zahájení signalizace přes imunoreceptory (TCR, BCR, Fc-receptory) hrají důležitou roli tzv. signalizační membránové mikrodomény („membrane rafts“) – jakési ostrůvky, které se od ostatní membrány liší lipidovým složením (obsahují hodně glykolipidů s dlouhými, nasycenými zbytky mastných kyselin a cholesterol). Z těchto mikrodomén je vyloučena většina transmembránových proteinů, jsou v nich však obohaceny některé cytoplasmatické proteiny (protein-kinasy skupiny Src, G-proteiny) a fosfolipidy (PIP2). Součástí mikrodomén jsou také některé tzv. transmembránové adaptorové proteiny (např. LAT a PAG). Cytoplasmatické a transmembránové proteiny jsou v mikrodoménách zakotveny pomocí kovalentně připojených mastných kyselin (myristová, palmitová). V signalizačních mikrodoménách je soustředěna většina molekul potřebných k zahájení imunoreceptorové signalizace. Poté co se imunoreceptory naváží na své ligandy (TCR na MHC protein na povrchu APC, BCR na antigen, Fc-receptor na imunokomplex), dojde k jejich agregaci a splynutí se mikrodoménami. Tím se dostanou cytoplasmatické konce řetězců imunoreceptorových komplexů do prostředí bohatého na protein-kinasy skupiny Src a ty je začnou fosforylovat na specifických tyrosinových zbytcích. Na tyto fosforylované tyrosiny se váží další důležité enzymy, protein-kinasy skupiny Syk, ty pak fosforylují další složky mikrodomén (např. adaptorový protein LAT), na které se váží další proteiny (např. Grb2, Sos, SLP-76, PLC) a tak se rozběhnou signalizační kaskády nezbytné k aktivaci buňky. Podstatným rysem tohoto modelu je to, že imunoreceptory nejsou v klidovém stavu s kinasami asociované – k tomu dojde až po rozeznání ligandu, agregaci a fúzi se signalizační mikrodoménou. V naší laboratoři bylo v posledních letech objeveno několik nových „raftových" transmembránových adaptorových proteinů a zabýváme se charakterizací nového typu membránových mikrodomén, tzv. „těžkých raftů“, které by mohly být funkčně významné.

8:30 – 9:20

Antonín Holý, Petr Jansa

Acyklické nukleosidfosfonáty po dvaceti letech – perspektivy v roce 2008

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, v. v.i. Praha.
E-mai: holy@uochb.cas.cz

V druhé polovině sedmdesátých let minulého století jsme po několikaletém systematickém studiu SAR závislosti v řadě nukleotidů modifikovaných na heterocyklické bázi, cukerné části a fosfátové skupině dospěli k zdánlivě prostému závěru: K tomu, aby chemicky modifikovaný analog nukleotidu byl dostatečně pevně vázán v EI komplexu s enzymem metabolismu NK (a mohl účinně inhibovat enzymem katalyzovanou reakci) musí být s přírodním metabolitem *isosterní* a *isopolární.* Má-li být ale látka použitelná v praktické chemoterapii, musí být dostatečně stálá v organismu. Stálost vůči enzymům katabolismu NK se ale dosud nepodařilo zajistit pouhou substitucí funkčních skupin. Zabezpečit to lze pouze apriorní změnou charakteru příslušné chemické vazby – např. substituovaným cyklopentylovým zbytkem místo pentofuranosy v karbocyklických analogách, nebo rozvolněním cukerné části nukleosidu na volně konformačně přizpůsobitelné acyklické analogy nukleosidů se změní labilní enzymově degradovatelná nukleosidová vazba na zcela rezistentní vazbu N-alkylderivátu heterocyklické báze. Nejbližší charakteru esterově vázanému zbytku fosforečné kyseliny (s azbami pořsdí atomů C-O-P) je fosfonomethyletherová funkce (O-C-P), která nejen splňuje všechny tři uvedené podmínky, ale navíc respektuje náš další empirický poznatek, že pro vyvolání biologického účinku je třeba přítommost atomu kyslíku v blízkosti atomu fosforu. Látky odvozené od acyklických nukleosidů substitucí hydroxylových skupin alkylového řetězce fosfonomethylovou funkcí jsou *acyklické nukleosidfosfonáty* (ANP).

ANP tvoří rodinu strukturně příbuzných sloučenin, N9-[2-fosfonomethoxyethyl]derivátů purinů, (adeninu, guaninu a 2,6-diaminopurinu (DAP) a jejich 3-deaza, resp 8-aza analogů (tzv. PME-deriváty). Účinné jsou pouze 9-isomery. Důležitou součástí farmakoforu je zřejmě amidinové seskupení na pyrimidinovém kruhu purinu. Pyrimidinové deriváty nejsou účinné proti virům, kdežto u ostatních nukleobazí, kromě hypoxanthinu byl zjištěn vysoký účinek proti virům Poloha beta postranního řetězce může být v omezeném rozsahu substituována methyl (PMP-řada), hydroxymethyl (HPMP-řada) nebo fluoromethylskupinou (FPMP-látky). Podle druhu řetězce se dostane účinek pouze na DNA viry (HPMP-látky) nebo na retroviry (MSV, Visna, HIV). Výjimkou z pravidla o výlučné vlastnosti purinů je cytosinový derivát HPMPC, který je velmi účinný proti všem DNA virům, včetně poxvirů a papilomavirů (generikum cidofovir, jako léková forma Vistide). Je to látka použitelná jako lék poslední naděje u infekcí DNA viry. Z dalších úspěšných látek je třeba uvést adefovir, PMEA, a hlavně tenofovir (PMPA), netoxický preparát proti HIV a HBV. Vzhledem k nízké biologické dostupnosti volných fosfonátů při orálním podání se s úspěchem používají neutrální profarmaka, která snáze procházejí buněčnou membránou. To je podstatou orálních lékových forem Hepsera (adefovir) a Viread (tenofovir), resp. jeho kombinace s emtricitabinem (Truvada) a ještě s efavirenzem (Atripla), vesměs pro léčení pacientů s AIDS. S tím souvisí i velká skupina N6-substituovaných derivátů látky PMEDAP, které podléhají konverzi na PMEG, velice účinný, ale silně toxický fosfonát s potenciálním využitím v léčbě nádorových onemocnění. Zvláštní postavení tu má N-cyklopropylderivát jako notoricky známý GS9219, v klinických zkouškách s indikací terapie nehodgkinských lymfomů.

Kromě evidentních směrů v humánní medicině (terapie akutních a chronických viros, leukemie a nádorová onemocnění) se nabízejí další zajímavé směry studia ANP – např. jejich imunomodulační účinek, možná optimalizace jejich již známého antiparazitického efektu, také již prokázaný terapeutický efekt u hospodářsky nebo jinak důležitých zvířat. I v říši rostlinné se mohou uplatnit – je známo vyléčení od zasažení virem květákové mosaiky nebo jinými *dsDNA viry*- ty totiž také využívají reverzní transkripci, obdobně jako retroviry. Zvlášť významné je to tam, kde se množí rostliny klonováním.

Ani možnosti návrhu a syntézy nových látek tohoto typu však nejsou zdaleka vyčerpány. Po open-ring analogách ANP jsou tu ještě open-ring – closed-ring systémy. Transport polárních látek přes buněčnou membránu bude ještě velkým problémem – zvláště transport cílený. Nebo způsob podání – v tomto směru studujeme např. transdermální aplikaci ANP spolu s urychlovačem průniku pokožkou jako jednu z možností, jak dosáhnout vyrovnané hladiny látky v krevní plasmě.

12:10 -13:00

Erik De Clercq

Antiviral activity of acyclic and cyclic nucleoside phosphonates

Rega Institute for Medical Research, K.U.Leuven, B-3000 Leuven, Belgium
E-mail: erik.declercq@rega.kuleuven.be
Tel.: +32-16-337367, Fax.: +32-16-337340

In collaboration with Prof. Anthonin Holý (1), I have discovered the antiviral activity of a series of acyclic nucleoside phosphonates, which have been approved for medical use and are now worldwide available for the treatment of herpesvirus (i.e. cytomegalovirus), papillomavirus, adenovirus, poxvirus infections [(*S*)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, HPMPC, cidofovir, Vistide®)], hepadnavirus (hepatitis B virus) infections [bis(pivaloyloxymethyl) ester of 9-(2-phosphonylmethoxy- ethyl)adenine, bis(POM)PMEA, adefovir dipivoxil, Hepsera®], and human immunodeficiency virus (HIV) infections (i.e. AIDS) [bis(isopropoxycarbonyloxymethyl) ester of (*R*)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)- adenine, bis(POC)PMPA, tenofovir disoproxil fumarate (TDF), Viread®] (2,3). TDF has also been marketed, in combination with emtricitabine, in a single once-a-day pill (Truvada®), and in combination with emtricitabine and efavirenz, also in a single once-a-day pill (Atripla®) for the treatment of HIV infections (4). Viread®, Truvada® and Atripla® may also be considered for prophylactic use, for preventing HIV infections (irrespective of the route of transmission (parenteral, sexual or perinatal). Moreover, Viread® has recently been formally approved for the treatment of chronic hepatitis B. In addition to these acyclic nucleoside phosphonates, other acyclic and cyclic nucleoside phosphonates are in (pre)clinical development: 2,4-diamino-6-(*R*)-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propoxy]pyrimidine [(*R*)-HPMPO- DAPy], 2,4-diamino-6-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEO-DAPy), 2,4-diamino-6- (*R*)-[2-(phosphonylmethoxy)propyl]adenine [(*R*)-PMPO-DAPy] (5), (*S*)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)- 5-azacytosine (HPMP-5-azaC), cyclic HPMPC and cyclic HPMP-5-azaC (6) and the octadecyloxyethyl (ODE) and hexadecyloxypropyl (HDP) esters of all these acyclic nucleoside phosphonates, the ethylalaninyl amidate phenol prodrug of phosphonomethoxy-2'-fluoro-2',3'-dideoxydidehydroadenosine (7), and the deoxythreosyl nucleoside phosphonates PMDTA and PMDTT (8).

References

1. De Clercq, E. & Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Rev. Drug Discovery*, 2005, 4: 928-940.
2. De Clercq, E. The acyclic nucleoside phosphonates from their inception to clinical use: historical perspective. Antiviral Res., 2007, 75: 1-13.
3. De Clercq, E. Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: the phosphonate bridge. Biochem. Pharmacol., 2007, 73: 911-922.
4. De Clercq, E. From adefovir to Atripla™ via tenofovir, Viread™ and Truvada™. Future Virology, 2006, 1: 709-715.
5. De Clercq, E., Andrei, G., Balzarini, J., Leyssen, P., Naesens, L., Neyts, J., Pannecouque, C., Snoeck, R., Ying, C., Hocková, D. & Holý, A. Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2005, 24: 331-341.
6. Krečmerová, M., Holý, A., Pískala, A., Masojídková, Andrei, G., Naesens, L., Neyts, J., Balzarini, J., De Clercq, E. & Snoeck, R. Antiviral activity of triazine analogues of 1-(*S*)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)- propyl]cytosine (cidofovir) and related compounds. *J. Med. Chem*., 2007, 50: 1068-1077.
7. Cihlar, T., Ray, A., Boojamra, D., Zhang, L., Hui, H., Grant, D., White, K., Desai, M., Parkin, N. & Mackman, R. GS9148: a novel nucleotide active against HIV-1 variants with drug resistance mutations in reverse transcriptase. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, Colorada, USA, 5-9 February 2006. Oral presentation no. 45.
8. Wu, T., Froeyen, M., Kempeneers, V., Pannecouque, C., Wang, J., Busson, R., De Clercq, E. & Herdewijn, P. Deoxythreosyl phosphonate nucleosides as selective anti-HIV agents. *J. Am. Chem. Soc*., 2005, 127: 5056-5065.

12:10 -13:00

Gabriela Bukovská

The analysis of bacteriophage BFK20 genome

Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovak Republic, e-mail:Gabriela.Bukovska@savba.sk

The bacteriophages (viruses from bacteria), first discovered by F. d'Herelle (1915) and F. W Twort (1917), have been always at the forefront of molecular biological research, both as model systems and as biological tool boxes for the study and manipulation of bacterial genes. In the EMBL database, we could find DNA segments from around 1000 different bacteriophages, but just for 484 bacteriophages the complete genome sequence was determined up to now (2008). According to Ackermann (2006) only the 5568 phages have been examined by electron microscopy until now, compare to the real number of existing phages in global population which is estimated to be the order of 10^{31}.

Corynephage BFK20 is a lytic phage of the industrial L-lysine producing strain Brevibacterium *flavum* CCM 251. It was described and characterized in 1992. Morphologically, the bacteriophage BFK20 belongs to an unclassified Siphoviridae sharing a similar genome organization with other members of this taxonomical group.

Bacteriophage BFK20 is the first corynephage with entirely sequenced and analyzed genome (EMBL Acc.no. AJ278322) and moreover with accomplished global gene expression analysis using DNA microarray approach. Microarray results were validated using real-time RT-PCR. Several bioinformatics approaches helped to identify 55 ORF on its genome and to predict their functions. Clusters of functionally related putative genes were defined (structural, lytic, replication and regulatory). To verify the annotation of structural proteins, BFK20 particles were resolved by 2D gel electrophoresis and individual proteins spots were submitted to N-terminal amino acid sequencing. The BFK20 portal and major and minor tail proteins were acknowledged. Based on the overall genome sequence comparison, quite extensive homology between BFK20 and other bacteriophages (particularly those using *Mycobacterium* spp. as hosts) genomes were detected for multi dot plot analysis. Our results support the theory that phage genomes are mosaics with respect to each other.

Our research is now focused on investigation of lytic and replication region on the corynephage BFK20 genome, specifying of replication module type, elucidation of DNA replication mechanism and regulation in bacterial host cell and characterization of biological activity of individual replication proteins. Corynebacteria are important industrial amino acids producers. They are widely used as starter culture in many biotechnological processes. The study of corynephage BFK20 replication will be a substantial contribution to enhance the knowledge of defense mechanisms of corynebacteria against bacteriophages.

Acknowledgement(s): This work was supported by the Grants VEGA 2/0127/08 and APVV-0354-07

Přednášky

O1
Membránové signalosomy

Dráber P.
Ústav molekulární genetiky AVČR, Praha
draberpe@img.cas.cz

Plasmatická membrána je klíčovou platformou komunikace buňky s vnějším okolím. Jedná se o vysoce dynamický útvar složený především z lipidů a proteinů. Nález nehomogenního rozložení lipidů a proteinů a omezené pohyblivosti těchto struktur v rovině plasmatické membrány vedly v roce 1982 k formulaci modelu lipidových raftů. Tento model předpokládá, že část lipidů, zvláště sfingolipidy a cholesterol, je lokalizována v lipidových raftech, které jsou svým lipidickým a proteinovým složením odlišné od neraftových domén. Výzkum těchto struktur byl založen především na předpokládané rezistenci lipidových raftů k solubilizaci v neiontovým detergens a snadné izolaci detergens-rezistentních membrán (DRM) pomocí hustotních gradientů. Z hlediska imunoreceptorové signalizace byl důležitý nález přesunu většiny vysokoafinitního receptoru pro IgE z detergens-sensitivních do detergens-rezistentních struktur v průběhu antigenní aktivace žírných buněk. Rovněž významné byly nálezy asociace řady signálních molekul s DRM. Výsledky nedávných studií s využitím nových metod analýzy membránových komponent na molekulární úrovni [imunoelektronová mikroskopie na izolovaných membránových plátech, FRET (fluorescence resonance energy transfer) a další] ukazují, že (1) všechny studované membránové proteiny jsou distribuovány na plasmatické membráně pouze v ostrůvcích (nehomogenně), (2) jak předpokládaně raftové tak i neraftové proteiny se nacházejí v diskrétních oblastech plasmatické membrány obohacených o cholesterol, (3) různé raftové proteiny nacházející se ve stejných DRM se mohou nacházet v různých ostrůvcích, (4) distribuce proteinů v ostrůvcích je regulována aktinovým cytoskeletem a (5) v průběhu buněčné aktivace dochází k významným změnám v topografii membránových molekul i komponent cytoskeletu a tvorbě funkčních signalosomů. Tyto nálezy vnášejí nové pohledy na strukturu plasmatické membrány a její úlohu v buněčné fyziologii.

O2
Konvergencie a divergencie bunkovej proteolýzy kontrolovanej receptorom pre manóza 6-fosfát

Leksa V., Schiller H. B., Kutejová E., Stockinger H.
Department of Molecular Immunology, Center for Physiology, Pathophysiology & Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic
Vladimir.Leksa@savba.sk

Proteolytický systém zohráva esenciálnu úlohu v množstve bunkových biologických procesov, ako napríklad degradácia poškodených a nefunkčných proteínov, aktivácia zymogénov a cytokínov, bunková migrácia, či apoptóza. Centrálne postavenie pri regulácii bunkovej proteolýzy zohrávajú proteázy a ich receptory. Receptor pre manóza 6-fosfát a inzulínu podobný rastový faktor 2 (M6P/IGF2R, CD222) je multifunkčný receptor, ktorý je zahrnutý vo všetkých spomenutých proteolytických procesoch v bunke. Činí tak vďaka svojej schopnosti viazať viaceré typy proteáz a ich receptory. M6P/IGF2R viaže catepsíny a je nevyhnutný pre degradáciu proteínov v lyzozómoch; prostredníctvom väzby na plazminogén a receptor pre urokinázu (uPAR, CD87) je dôležitý pri proteolytickej aktivácii TGF-beta; a viaže granzyme-B, čím sa zúčastňuje na apoptotickej kaskáde. Vo svojej prednáške zhrniem všetky tieto funkcie M6P/IGF2R pri kontrole bunkovej proteolýzy a podrobne sa budem venovať jeho úlohe pri regulácii bunkovej migrácie.

O3

Jak přelstít fagocyty prezentující antigeny: Molekulární triky toxinu zvyšujícího hladinu cAMP

Šebo P., Adkins I., Basler M., Benada O., Bumba L., Fišer R., Holubová J., Kamanová J., Kofroňová O., Konopásek I., Krůšek J., Linhartová I., Mašín J., Morová J., Osička R., Osičková A., Staněk O., Šimšová M., Vojtová J.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.; Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i, Přírodovědecká fakulta UK Praha
sebo@biomed.cas.cz

Bordetella pertussis je Gram-negativní bakterie, která se šíří kapénkovou infekcí, kolonizuje průdušnici a vyvolává obávané dětské onemocnění zvané černý kašel. Bordetella je vybavena celou řadou faktorů virulence, mezi nimiž klíčové postavení zaujímá tzv. adenylát cyklázový toxin (ACT). Tento jedinečný RTX (Repeats in ToXin family) protein o 1706 aminokyselinových zbytcích je sekretován bakterií do prostředí a specificky se váže na beta-2 integrin CD11b/CD18 známý též jako komplementový receptor fagocytů (CR3, Mac-1). Ten je exprimován především myeloidními fagocyty schopnými zabíjet patogeny a prezentovat antigeny, jako jsou neutrofily, makrofágy a dendritické buňky, jež hrají klíčovou roli jak ve vrozené tak v adaptivní imunitní odpovědi. ACT po vazbě na receptor CD11b proniká do cytoplasmatické membrány fagocytů, čímž umožní vstup vápenatých iontů a uvolnění integrinu CD11b/CD18 z vazby na aktinový cytoskelet. Po přesunu integrinu s ACT do lipidových raftů v membráně pak dojde k translokaci enzymatické domény (AC) do cytosolu buněk, kde AC doména katalyzuje přeměnu ATP na cAMP. Tím ACT dereguluje buněčnou signalizaci a vyvolá inaktivaci malé GTP-asy RhoA. To má za následek prudkou reorganizaci aktinového cytoskeletu a rychlou a efektivní inhibici komplementem-zprostředkované fagocytosy i makropinocytosy. Krom toho signalizace cAMP vyvolá sekreci zmatečné směsi cytokinů, neúplnou maturaci dendritických buněk a snížení jejich schopnosti prezentovat antigeny na MHC molekulách T lymfocytům. Mimo to ACT vytváří oligomerní póry, které permeabilizují buněčnou membránu. V přednášce pojednám o výsledcích naší laboratoře získaných při objasňování detailů procesu průniku ACT do buněk a při odhalování molekulárních mechanismů působení ACT, jež vedou k vyřazení baktericidních a antigen-prezentačních funkcí fagocytů. V závěru pak demonstruji jak lze využít poznání vztahu struktury a funkce detoxifikovaného ACT pro konstrukci nových nástrojů pro očkování a imunoterapii nádorů.

O4

Lektiny bez afinity k sacharidovým ligandům? Hledáni ligandu pro aktivační receptory přirozených zabíječských buněk a jejich využití v nádorových terapiích

Bezouška K.
Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta a MBÚ AV ČR v.v.i.
bezouska@biomed.cas.cz

Buňky imunitního systému neexprimující klasické receptory pro antigen typu B nebo T buněčného receptoru používají pro aktivaci nebo inhibici svých efektorových funkcí jiné typy receptorů založených na slabších molekulárních interakcích. Nápadné je to zejména v případě přirozených zabíječských buněk, lymfocytární populace důležité při ochraně organismu před virově infikovanými, nádorově transformovanými, nebo stresem pozměněnými buňkami. Pro rozpoznání takových cílových buněk používají přirozené zabíječské buňky receptorů náležících jednak do imunoglobulinové superrodiny, jednak do rodiny lektinů C-typu, respektive její podrodiny V. Tato podrodina se ve své evoluci velmi vzdálila klasickým živočišným lektinům, interakční povrch původně přizpůsobený pro vazbu sacharidových ligandů byl v průběhu evoluce pozměněn, a je schopný interagovat s jinými ligandy včetně ligandů proteinové povahy, jakými jsou například MHC glykoproteiny I. třídy u některých receptorů inhibiční povahy. Pokud jde o aktivační lektinové receptory přirozených zabíječských buněk, některé z nich vstupují do velmi zajímavých interakcí typu lektin – lektin (hNKR-P1 – hLLT-1, mNKR-P1D – mClrb, mNKR-P1F – mClrg), nebo rozpoznávají široké spektrum nízkomolekulárních látek zahrnující některé neutrální a kyselé sacharidy, kyselé peptidy, a dokonce karboxylované kalixareny (CD69 antigen). V přednášce budou popsány experimenty vedoucí k identifikaci těchto ligandů, a dále konstrukce ligandových dendrimerů a jiných ligandových mimetik účinných v experimentálních terapiích nádorů.
Podporováno granty od MŠMT (MSM_21620808 a 1M_4635608802), GAČR (204/06/0771), a GAAV (IAA5020403).

O5
Role proteinu AHNAK ve vápníkové signalizaci a exocytóze

Černý J.
Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Viničná 7, Praha 2, 120 00
janmartincerny@seznam.cz

AHNAK/desmoyokin je široce exprimovaný obří adaptorový protein (cca 700 kDa). Skládá se ze tří strukturních jednotek – N-terminální globulární domény, velké repetitivní centrální domény a C-koncové domény. V epiteliálních buňkách je lokalizován na plasmatické membráně, v ostatních buněčných typech osciluje mezi cytoplasmou, membránou a jádrem v závislosti na intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů. Za funkční translokaci proteinu AHNAK je zodpovědná jeho C-koncová doména, která např. v kardiomyocytech asociuje s regulační b2 podjednotkou srdečního Ca^{2+} kanálu typu L. Na plasmatické membráně AHNAK interaguje s komplexem Annexin2/S100A10 a reguluje uspořádání kortikálního aktinového cytoskeletu.
Velice zajímavá je intracelulární lokalizace proteinu AHNAK do lumen unikátních váčků o průměru cca 100 mm. Zdá se, že tyto váčky jsou zapojeny do procesů reparace plasmatické membrány a zvětšování její plochy (odtud označení elargeosomy). Např. v dendritických buňkách jsou enlargeosomy zapojeny do makropinocytosy – té předchází po zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} exocytosa enlargeosomů následovaná makropinocytickou internalizací plasmatické membrány. Enlargeosomy zde zřejmě slouží jako mobilní zásobárny membrány exocytovatelné před masivní endocytosou. Přestože knock-out pro AHNAK1 nevykazuje žádné zřejmé patologie (zřejmě díky existenci sekvenčního homologu AHNAK2), výzkum soustředěný na CD^{4+} T lymfocyty ukázal jeho klíčovou roli v signalizaci. Myši postrádající protein AHNAK1 jsou vysoce citlivé k infekci *Leishmania major*. CD^{4+} T lymfocyty derivované z této myši odpovídají na stimulaci TCR (T-cell receptor) velice slabě. Celkově je snížen vtok vápenatých iontů po prokřížení TCR s následnou slabou aktivací transkripčního faktoru NFAT. Tento deficit je zřejmě způsoben tím, že AHNAK1 je nezbytný pro expresi vápenatých kanálů a1S (Cav1.1) na plasmatické membráně, zřejmě svou interakcí s regulační podjednotkou b.

O6
Neusporiadany protein „tau“ v patogeneze Alzheimerovej choroby

Novak M., Zilka N., Skrabana R.
Neuroimunologicky ustav SAV
michal.novak@savba.sk

Protein tau patrí medzi takzvané prirodzene neusporiadané proteiny, ktoré nemajú jednoznačnú a stabilnú trojrozmernú štruktúru vo voľnom stave. Patologická premena konformácie proteinu tau predstavuje kľúčový molekulový mechanizmus patogenézy u skupiny ľudských neurodegeneračných ochorení (tauopátií), z ktorých najvýznamnejšou je Alzheimerova choroba. V priebehu Alzheimerovej choroby podstupuje protein tau fatálne posttranslačné modifikácie, zahŕňajúce proteolytické štiepenie a hyperfosforyláciu, ktoré spôsobujú jeho prechod z rozpustnej fyziologickej formy na vysoko nerozpustnú formu s patologickou konformáciou. Štruktúrna premena proteinu tau a montáž jeho oligomérnych foriem priamo súvisí s postupom ochorenia, ktoré môže byť dôsledkom straty fyziologickej funkcie proteinu tau ako aj toxickým pôsobením tvoriacich sa patologicky zvinutých konformérov tau. Objasnenie mechanizmov a trajektórií, na ktorých sa z prirodzene neusporiadaného proteinu tau bez detekovateľnej sekundárnej štruktúry stane patologicky zvinutý tau konformér s vysoko usporiadanou vnútronou štruktúrou predstavuje jeden zo základných mílnikov kľúčových pre vývoj účinnej terapie Alzheimerovej choroby.

Postery

P1
Different isoforms of CD46 expressed on bovine spermatozoa, male and female genitals

Antalíková J., Jankovičová J., Simon M., Horovská Ľ., Fábryová K.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov, SAV, Ivanka pri Dunaji
Jana.Antalikova@savba.sk

Membrane cofactor protein (MCP/CD46) serves as complement regulatory and probably plays also a role in reproduction. CD46 is widespread membrane glycoprotein expressed as four major isoforms arise by alternative splicing. MCP of human spermatozoa migrates as a single band, as opposed to the double band observed in the most tissues and it is 5-10 kDa lower in molecular weight than MCP expressed elsewhere. The 50-58 kDa proteins in several bovine tissues were also detected however, either information regarding the expression of CD46 on bovine sperm or its probable function in reproduction process wasn't presented.
Using the monoclonal antibody IVA-520 against bovine CD46 (obtained after intrasplenic immunisation of BALB/c mice with intact bull spermatozoa) in western blot analysis of the solubilized bovine sperm proteins 43 and 53 kDa molecules were detected. The same analysis of solubilized reproductive tissues revealed the different protein pattern in male and female genitals. In uterus, vagina and ovary mAb IVA-520 recognised 47 and 69 kDa protein resembled those of non-reproductive tissues while in epididymis, testes, seminal vesicules and rete testes predominantly 69 and 104 kDa proteins were detected. Double protein band in bovine sperm we suppose due to expression of different isoforms of CD46 on plasma membrane as well as in acrosomal content and inner acrosomal membrane of bovine spermatozoa.

This work was supported by grants VEGA2/6023/6 and APVV 51-024904.

P2
Krížová reaktivita monoklonových protilátok detegujúcich CD molekuly hovädzieho dobytka s bunkami králika

Horovská Ľ., Simon M., Fábryová K., Antalíková J., Jankovičová J., Chrenek P., Tančin V.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji, Centrum poľnohospodárskeho výskumu, Nitra
lubica.horovska@savba.sk

Diferenciačné molekuly (CD antigény) sú úzko viazané s funkciami imunitného systému, preto ich identifikácia je dôležitá pre štúdium imunitného systému u rôznych živočíšnych druhov. Vzhľadom k náročnej príprave protilátok, zisťovanie medzidruhovej krížovej reaktivity monoklonových protilátok detegujúcich CD molekuly môže byť účinné pri identifikácii homológnych CD molekúl iného druhu. V práci sme testovali krížovú reaktivitu 26 monoklonových protilátok určujúcich dobre definované CD molekuly hovädzieho dobytka s bunkami králikov. Štyri protilátky reagovali krížovo s bunkami králika ale len protilátka IVA-50 mala podobný reakčný vzor ako na bovinných bunkách. Molekula detegovaná na králičích bunkách mala charakteristické črty molekuly CD9. Rovnakú relatívnu molekulovú hmotnosť (22-24 kDa) stanovenú western blot analýzou proteínových extraktov trombocytov a niektorých tkanív za neredukovaných podmienok u oboch druhov, výraznú expresiu na trombocytoch, menej výraznú na polymorfonukleárnych leukocytoch a dominantnú expresiu v obličkách, tenkom čreve, slezine a v pečeni. Výsledky poukazujú na to, že IVA-50 sa môže využívať pri identifikácii CD9 na králičích bunkách.

Práca bola podporovaná grantom VEGA 2/6023/6 a grantom APVV 51-024904

P3
Erytrocyte isoform of CD46 protein as a regulator of bovine complement aktivity

Jankovičová J., Antalíková J., Simon M., Horovská Ľ., Fábryová K.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji
jana.jankovicova@savba.sk

CD46 is a widely expressed cell surface complement regulator which serves as a cofactor for the factor I-mediated cleavage of C3b- and C4b- fragments deposited on the self-tissue. Homologous molecules to CD46 have been identified in many species. CD46 has been detected in the cattle, however, was only partially characterized. Moreover, no data were available regarding the regulatory role of bovine CD46 in the complement activation. In this study, expression of bovine CD46 antigen on the blood cells by means of monoclonal antibody IVA-520 has been described as well as the inhibitory activity of CD46 expressed on erythrocytes was shown. Reactivity of IVA-520 has been revealed on all types of blood cells in ELISA test and different isoforms were detected by immunoblotting method. On lymphocytes and trombocytes we observed broad double band with molecular weights 47-52 kDa. On granulocytes in addition 63 kDa isoform was found. In the sample of ghosts (erythrocytes without hemoglobin) a discrete one band protein with Mr-50 kDa has been appeared. For isolation of purified of CD46 from bovine ghosts the immunoaffinity chromatography with monoclonal antibody IVA-520 has been used and particular components of bovine complement (factor I, factor H, C3 fragment) were obtained by anion exchange chromatography. Finally, alternative pathway of complement cascade has been induced in vitro and the cleavage product of factor I (serine protease) in the presence of CD46 molecule appeared.

This work was supported by grants VEGA 2/6023/6; APVV 51-024904.

P4
Biochemická charakterizácia býčieho spermiového antigén pomocou monoklonovej protilátky IVA -543

Fábryová K., Antalíková J., Jankovičová J., Simon M., Horovská Ľ.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji
katarina.fabryova@savba.sk

Monoklonová protilátka (mAb) IVA-543 rozpoznáva antigén lokalizovaný na cytoplazmatickej membráne býčích ejakulovaných spermií. Pomocou tejto protilátky sme analyzovali biochemické vlastnosti detegovaného antigénu.
Western blot analýza ukázala, že molekulová hmotnosť antigénu sa pohybuje v rozmedzí 18-24 kDa. Po opracovaní spermiového lyzátu neuraminidázou sa molekulová hmotnosť znížila približne o 2 kDa. Tento výsledok pokazuje na to, že antigén je modifikovaný väzbou kyseliny sialovej na O-viazané cukry. Vplyv glykopeptidázy F a O-gykozidázy sa za tých istých experimentálnych podmienok neprejavil.
Ďalšie analýzy ukázali, že opracovanie intaktných spermií fosfatidyl-inozitol špecifickou fosfolipázou C (PI-PLC) spôsobuje zníženie reakcie IVA-543 so spermiami zo 100% na menej ako 30%. Tento výsledok naznačuje, že antigén je viazaný v cytoplazmatickej membráne glykozyl-fosfatidyl-inozitolovou (GPI) kotvou. Antigén vo Western blot analýze, po opracovaní spermiových lyzátov PI-PLC, nebol detegovateľný, čo poukazuje na to, že GPI kotva sa podieľa na epitope antigénu pre mAb IVA-543.

Realizácia projektu bola finančne podporená grantom VEGA 2/6023/6 a APVV 51-024904.

P5
Příprava fúzních antigenů vyvolávajících specifickou buněčnou imunitní odpověď

Zachová K., Křupka M., Běláková J., Horynová M., Raška M.
Ústav Imunologie Univerzity Palackého Olomouc
katkakol@post.cz

Proteiny tepelného šoku (hsp) hrají nezastupitelnou roli při tvorbě i degradaci celé řady buněčných proteinů. V posledních letech byla u některých hsp proteinů prokázána schopnost transportovat fragmenty proteinů mezi buňkami a přenášet je na MHC I i MHC II molekuly cílových buněk (fenomén označovaný „cross presentation"). Proto se testují vakcíny založené na fúzi antigenního proteinu s hsp proteiny, které by měly umožnit indukci specifické buněčné (CD8 T lymfocytární) imunitní odpovědi. Cílem práce byla fúze myšího proteinu tepelného šoku hsp70 (hsp70mm) s proteinem p24, který je považován za významný antigen viru HIV-1, a je spojen se specifickou buněčnou imunitní odpovědí hostitele. cDNA hsp70mm a p24 byly vneseny do prokaryontního expresního vektoru pET101. Byly vytvořeny dvě fúzní formy hsp70 + p24 a to s p24 na N-konci a p24 na C-konci. Jako kontrola byly připraveny pET101 plasmidy obsahující jen hsp70mm nebo p24. Z expresního vektoru pET101 se tyto fúzní proteiny exprimují s V5 a His epitopy (značkami). Pro expresi byla použita linie E. coli BL21 (DE3) a proteiny byly purifikovány z buněčné pelety pomocí NiNTA afinitní kolony za nativních podmínek. Identita byla potvrzena pomocí anti-V5 protilátky (Western blot) a dále pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF). Při afinitní purifikaci se kromě fúzních hsp70mm proteinů, nebo samotného hsp70mm či p24 purifikoval další protein – glukosamin-fruktosa-6-fosfát aminotransferasa (GFPD). Vzhledem k tomu, že GFPD je zapojena do hexosaminové kaskády při biosyntéze N-glykanů, bylo kultivační médium experimentálně suplementováno meziprodukty hexosaminové kaskády s cílem indukovat pokles exprese GFPD. Po přidání N-acetyl-D-glukosaminu došlo k poklesu exprese GFPD pod detekovatelnou míru. V posledním kroku byly testovány různé metody depyrogenace proteinů. Jako nejúčinnější se ukázala extrakce lipopolysacharidu do Triton-X114, čímž se snížily hladiny endotoxinu na hodnoty požadované pro vakcinační preparáty.

(Za podpory grantů MuNanoVac LSHP-CT-2006-03720 a MSM 6198959223)

Přednášky

O7
Rozdíly ve flexibilitě aktivních center P450

Anzenbacher P., Anzenbacherová E., Otyepka M., Hudeček J.
Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav farmakologie; Ústav lékařské chemie a biochemie; Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální chemie; Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Katedra biochemie
anzen@seznam.cz

Krystalové struktury membránových jaterních mikrosomálních cytochromů P450 znamenaly obrovský pokrok v poznání vlastností těchto enzymů klíčových pro metabolismus léčiv a dalších cizorodých látek nejen u člověka. Brzy se ale ukázalo, že samotná 3D struktura aktivního místa získaná x-paprskovou krystalografií nedává odpověď na jejich širokou substrátovou specifitu až promiskuitu a dále, že např. záměna aminokyselinových zbytků v aktivním místě nezmění substrátovou specifitu enzymu, ani když je několikanásobná. Odpovědí je evidentně nutnost chápat aktivní místo v celé šíři jeho vlastností, včetně flexibility a tedy schopnosti substrát vázat a přizpůsobit se mu. Protože substrátové specifity různých forem cytochromu P450 se výrazně liší, liší se – a to zásadně – i flexibilita jejich aktivních míst. Nejflexibilnější je forma CYP3A4, k nejméně flexibilním aktivním místům patří ta, náležející CYP2A6, CYP1A2 nebo CYP2D6 (po vazbě inhibitoru). K metodám studia flexibility aktivních míst, které byly použity, patří metody experimentální (absorpční spektroskopie za vysokého tlaku, resonanční Ramanova spektroskopie) i teoretické (metody molekulární dynamiky). Výsledky jasně korelují se substrátovou specifitou jednotlivých forem – jak již bylo uvedeno, nejflexibilnější aktivní místo má právě ta forma cytochromu P450, která vykazuje největší substrátovou promiskuitu.

Poděkování. Práce na tomto projektu je financována MŠMT (VVZ 6198959216) a částečně projektem GA AV ČR KAN 200200651.

O8
Interakce cytochromů P450 se substráty: Kolik a jak?

Hudeček J., Hodek P.
Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, CZ 12843 Praha 2, Czech Republic
hudecek@natur.cuni.cz

Cytochromes P450 are monoxygenases acting on a variety of hydrophobic substrates. During the last decade, a substantial progress has been made in our understanding of the structure of these enzymes. Crystallographic results are now available for several P450 enzymes, in some cases with substrate (or inhibitor) molecules bound. Despite that, there are still many questions open, regarding the mode of interaction between enzyme active site, hydrophobic substrate and oxygen. To summarize the most important ones:
(i) How many substrate-binding sites are present? Some P450 enzymes are known to be able to accommodate two substrate molecules in the vicinity of heme.
(ii) What kind of conformational changes might be caused by substrate-binding and what might be the mechanism of such changes? In most cytochromes P450, the substrate binding and heme iron reduction are strongly interrelated. In addition, the substrate binding is often cooperative.
(iii) How the substrate enters the enzyme? Does it bind directly, coming from the aqueous environment, or is it pre-concentrated in the membrane first? Moreover, in some P450 forms, the heme iron is relatively unaccessible, and the whole process may need some sort of trigger.
(iv) How is the P450 interaction with other membrane proteins (its reductase and cytochrome b5) influencing binding of substrate? Some of their predicted binding domains on cytochrome P450 coincide with the known external (regulatory) sites for substrate-binding.
The recent state of knowledge will be discussed, also on the basis of our own results from photoaffinity labeling and molecular modeling studies.

This work was financially supported by GA ČR grants 203/06/0329 and 303/06/0928.

O9
Role cytochromu P450 a peroxidas v metabolické aktivaci a intoxikaci protinádorového preparátu ellipticinu

Stiborová M., Frei E.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague; Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Heidelberg
stiborov@natur.cuni.cz

Ellipticine is an antineoplastic agent, whose prevalent mechanisms of antitumor, mutagenic and cytotoxic activities are intercalation into DNA and inhibition of DNA topoisomerase II activity. Based on data found by us, ellipticine should be considered a drug, whose pharmacological efficiency and/or genotoxic side effects are dependent also on its cytochrome P450 (CYP) and/or peroxidase-mediated activation in target tissues. We demonstrated a new mode of ellipticine action, formation of covalent DNA adducts mediated by its oxidation with CYPs and peroxidases. Such DNA adducts were found in vitro, in V79 cells transfected with human CYP1A1, 1A2 and 3A4, human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, human leukemia HL-60 and CCRF-CEM and neuroblastoma cell lines and in vivo in target and non-target tissues of rats and mice exposed to ellipticine. We report the molecular mechanism of ellipticine oxidation by CYPs and identifies human, rat and mouse CYPs responsible for ellipticine metabolic activation and detoxication. We also present a role of peroxidases (i.e. MPO, LPO, COX) in ellipticine oxidation leading to ellipticine-DNA adducts. The 9-hydroxy- and 7-hydroxyellipticine formed by CYPs and the major product of ellipticine oxidation by peroxidases, the ellipticine dimer, are the detoxication metabolites. 13-Hydroxy- and 12-hydroxyellipticine, formed by ellipticine oxidation with CYPs, the latter one formed also spontaneously from another metabolite, ellipticine N2-oxide, are metabolites responsible for formation of two ellipticine-derived deoxyguanosine adducts in DNA. The results shown here allow us to propose species, two carbenium ions, ellipticine-13-ylium and ellipticine-12-ylium, as reactive species generating two major DNA adducts seen in vivo in rats and mice treated with ellipticine. The study forms the basis to further predict the susceptibility of human cancers to ellipticine.

Supported by GACR (203/06/0329) and Czech Ministry of Education (MSM0021620808).

O10
Význam lidské aldo-keto-reduktasy v metabolismu xenobiotik

Wsól V.
Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova
wsol@faf.cuni.cz

Although human is an aerobic organism and oxidative pathways predominating, reductive reactions are found to be more significant than we expected. Among many reductive enzymes and families of reductases, aldo-keto reductase (AKR) superfamily is one, which is a rapidly growing gene superfamily. The superfamily consists of 15 families, which contain 152 members. Thirteen human AKRs, which are monomeric, cytosolic and NAD(P)H-dependent, is spread out over 6 families. Human AKRs are involved in many important reactions covering activation of some carcinogenic compounds, pre-receptor regulation of steroid receptors and nuclear orphan receptors, or deactivation of some anticancer drugs. They use endogenous substrates as readily as exogenous ones. Exogenous substrates include metabolites implicated in chemical carcinogenesis: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols, and aflatoxin dialdehyde. The human AKRs are highly polymorphic, and in some instances single nucleotide polymorphisms (SNPs) exist. Some human AKRs are potential targets in treating prostate cancer, breast cancer, endometriosis and endometrial cancer

This project was supported by Grant Agency of the Czech Republic, Grant No 303/07/0994.

O11
Sanguinarin – biologická aktivita *in vitro* a *in vivo*

Ulrichová J., Šimánek V.
Ústav lékařské chemie a bicohemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc
jitka.ulrichova@upol.cz

Kvartérní benzo[c]fenanthridinový alkaloid sanguinarin, obsažený v rostlinách Sanguinaria canadensis, Macleaya cordata nebo Chelidonium majus (Papaveraceae), je studován pro své široké spektrum biologických aktivit a zajímavý farmakologický profil. Protizánětlivé a antimikrobiální účinky sanguinarinu jsou využívány v prostředcích ústní hygieny a M. cordata je aktivní složkou přírodního aditiva do krmiv hospodářských zvířat (Sangrovit®). Achillovou patou sanguinarinu jsou výsledky in vitro studií ve vztahu k možným nežádoucím účinkům jako mutagenicita, genotoxicita a/nebo kardiotoxicita. Sanguinarin a jeho dihydroderivát jsou stále uváděny jako toxické složky oleje semen Argemone mexicana (Papaveraceae), jehož požití je příčinou intoxikace označované jako „epidemic dropsy syndrom".
Naše experimenty se sanguinarinem in vitro a in vivo byly zaměřeny na hledání molekulárních cílů v živočišné buňce včetně studie ovlivnění některých signálních drah receptoru pro aromatické uhlovodíky a na studium mechanismu jeho metabolické transformace, biodistribuce a farmakokinetiky u potkana. Popsali jsme rychlou eliminaci sanguinarinu z organismu a dihydrosanguinarin jako jeho hlavní metabolit. Nebyl nalezen v literatuře dosud jediný uváděný metabolit sanguinarinu – benzo[c]akridin. V 90-denní studii na potkanech jsme z výsledků histologické charakterizace vybraných tkání, parametrů klinické biochemie, oxidačního stresu, aktivity a hladiny cytochromu P450, hematologických ukazatelů, analýzy jaderné DNA v lymfocytech a absence aduktů s DNA v játrech prokázali, že aplikace sanguinarinu per os je pro savce bezpečná až do dávky 56 mg/den/kg živé váhy.

Poděkování: Práce je podporována grantem GAČR 525/07/0871.

O12
ABC-transportéry pri bunkovej ochrane proti toxickému stresu

Breier A., Barančík M., Sulová Z.
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
albert.breier@savba.sk

Názov ABC transportérov/proteínov bol odvodený od existencie takzvanej väzbovej kazety pre ATP (ATP-Binding Cassette) ktorá je štrukturálnym klasifikačným prvkom týchto proteínov. ABC transportéry pozostávajú popri NBD z Trans-Mebránových-Domén (TMD). Tieto domény tvorí spravidla 6 transmembránových helixov. Rozoznávame takzvané úplné transportéry, ktoré sú najčastejšie a sú tvorené sekvenciou N-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2-C. Vyskytujú sa aj v sekvencii N-NBD1-TMD1-NBD2-TMD2-C – tzv. úplné transportéry s reverznou štruktúrou. Funkčnú jednotku v membráne tvorí jedna molekula takéhoto transportéru. Poznáme polovičné transportéry so sekvenciou N-TMD-NBD-C, ktorá je častejšia, ale vyskytuje sa aj N-NBD-TMD-C – tzv. polovičné transportéry s reverznou štruktúrou. Pre vytvorenie funkčnej jednotky v membráne polovičné transportéry dimerizujú. Môžu pri tom vytvárať homodiméry aj heterodiméry.
ABC proteíny sa klasifikujú podľa štruktúrnych a funkčných parametrov do 7 skupín: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG. Členovia skupín ABCE a ABCF sú len ATP viažucimi proteínmi, ktoré nie sú membránovými transportérmi.
Za nepatologických podmienok niektoré ABC transportéry majú funkčný význam napr v endoteliálnych bunkách cievnych kapilár, kde sú orientovane lokalizované a spolupodieľajú sa napríklad na zabezpečovaní ochrany mozgu v takzvanej hemo-encefalickej bariére. Spolupodieľajú sa tiež pri ochrane plodu tak, že účinne zabraňujú prestupu toxických látok v placente z krvnej cirkulácie matky do krvnej cirkulácie dieťaťa. Ich význam bol opísaný aj pri zabezpečovaní prestupu látok v pečeni, nadobličkách, črevách a mnohých iných tkanivách.
V neoplastických bunkách má ich nadmerná expresia za následok radikálne zníženie bunkovej citlivosti na rôzne cytotoxické látky čo zásadne znižuje efektivitu chemoterapie nádorových ochorení.

Táto práca bola podporená: APVV-0084-07, VEGA- 2/7122/7 a VEGA 2/6080.

O13

Xenobiochemie není dnes jen vědou o biotransformaci cizorodých látek – efekty aromatických sloučenin na signální transdukci a mezibuněčnou komunikaci

Machala M., Zatloukalová J., Šimečková P., Umannová L., Krčmář P., Pěnčíková K., Andrysík Z., Vondráček J.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství,v.v.i., Brno; Biofyzikální ústav AV ČR, Brno
machala@vri.cz

Xenobiochemie se tradičně zabývá hlavně metabolismem cizorodých látek a biotransformačními enzymy. Řada mechanismů toxických efektů xenobiotik je založena na interakcích cizorodých látek s transkripčními faktory (AhR, ER, AR, NF-kB aj.), které souvisejí i s regulací proliferace, apoptózy a buněčné diferenciace a které hrají roli např. v endokrinní disrupci, nádorové promoci a dalších negativních účincích toxických látek.

Naše současné výsledky naznačují, že modulace intracelulárních signálních drah polyaromatickými sloučeninami zahrnuje celou řadu mechanismů. Ukazuje se, že vedle často studovaných signálních drah, jako jsou např. dráhy zahrnující mitogen-aktivované proteinkinázy, mohou tyto látky ovlivňovat také enzymy podílející se na syntéze či metabolismu lipidních signálních molekul (např. kyselina arachidonová, ceramid apod.). Modulace aktivity těchto enzymů může tedy následně významně ovlivnit také hladiny těchto látek v buňkách a především v buněčných membránách. Vedle těchto účinků dochází také k narušení mezibuněčné komunikace zprostředkované gap junctions a adherens junctions. Byla prokázána suprese hladin proteinů podílejících se na těchto typech mezibuněčné komunikace (konexinu, E-kadherinu, beta-kateninu a gama-kateninu). Některé cizorodé látky jako např. 2,2‘,4,4‘,5,5‘-hexachlorobifenyl také zvyšovaly fluiditu cytoplazmatické membrány a snižovaly hladiny kaveolinů, hrajících významnou roli ve struktuře membránových raftů.

Změny genové exprese, narušení signální transdukce, efekty na úrovni buněčných membrán a disrupce mezibuněčných spojení mohou významně přispívat k modulacím proliferace a apoptózy transformovaných buněk, jejich přežívání a nádorové promoci. [Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MZe0002716201 a grantem GA ČR 524/06/0517]

Postery

P7

Effects of antidepressant fluoxetine (prozac-tm) on the metabolism of thyroid hormones

Pavelka S.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno and Department of Radiometry, Institute of Physiology, ASCR, Prague 4
pav@chemi.muni.cz

We have followed the effects of subchronic administration of antidepressant fluoxetine (Prozac-TM), alone or in combination with 3,5,3'-triiodothyronine (T3), on the metabolism of thyroid hormones in the rat. In the course of our previous studies on fluoxetine effects, we namely encountered, in rats that were treated with fluoxetine in combination with T3, a very significant fall in preceding, experimentally elevated T3 plasma levels. In the present study, we intended to explain these unexpected observations. For this purpose, we have used newly introduced radiometric enzyme assays for iodothyronine glucuronyltransferases (GT) and sulfotransferases (ST), along with our newly developed radiometric assays for iodothyronine deiodinases (IDs) of the types 1, 2 and 3 (D1, D2 and D3, respectively).
The measurements of GT and ST activities did not demonstrate any significant effects of the administration of fluoxetine, alone or together with T3, on the induction of these enzymes. However, we found that the treatment of rats with fluoxetine alone caused a moderate increase in D2 and, in turn, a slight decrease in D3 activities in cerebellum and some other regions of the CNS. No significant changes in D1 activity were detected. On the other hand, the administration of T3 alone caused, in accordance with our expectation, a substantial decrease in pituitary D2 activity and a simultaneous increase in D1 and D3 activities practically in all tissues studied. In contrast with the effects of T3 by itself, treatment of the rats with the combination of fluoxetine plus T3 did not cause any significant elevation of D1 and D3 activities.
Acknowledgements: This work was supported by the Academy of Sciences of the CR (research project AV0Z50110509), by the Ministry of Education of the CR (research project MSM0021622413) and by the Grant Agency of the ASCR (Grant No. KJB401630701).

P8

Are the biological membranes site of action of new class of pyridinedicarboxylate Cu (II) complexes?

Miko M., Jantova S., Konarikova K.
Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Univ. of Technology, Bratislava, Slovakia
milan.miko@stuba.sk

In our previous paper we have studied effects of new class of pyridinedicarboxylate Cu (II) complexes (PDC) with biologically active ligands on energy-producing processes in Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells. Complexes can be divided into two groups a) derivatives of 2,6-pyridinedicarboxylic acid (8 complexes) and b) derivatives of 2,3-pyridinedicarboxylic acid (3 complexes). The aerobic glycolysis of EAC cells was most inhibited by complexes No. 2 [e.g. diaqua-(2,6-pyridinedicarboxylate Cu(II))] and No. 8 [e.g. nicotinamide-(2,6-pyridinedicarboxylate Cu(II))]. The attachment of cooper (II) ions and nicotinamide essentially increased the inhibitory effect of tested complexes. Complex 2 was also most effective inhibitor of endogenous respiration. Therefore we selected complex 2 for detailed biochemical studies. We supposed that the inhibitory effect on processes examined could be caused by the interaction of these complexes with biological membranes of EAC cells. An orientation indicator of biological membrane damage is also the release of cytoplasmic materials absorbing at 260 nm (purines and pyrimidines) and 280 nm (proteins with Try, Trp, Phe). Complex 2 causes increases of the absorbance in the concentration range 75 to 600 umol/L. Another indicator of the membrane damage is the monitoring of protein concentrations in both EAC cells and the culture medium. A significant release of proteins occurs at concetration higher than 75 umol/L, which is in agreement with UV-absorbing materials. The direct evidence of affecting the integrity of biological membranes comes from the measurement of “marker” enzyme activity LDH (EC.1.1.1.27) in the culture medium. Complex 2 after 120 min. incubation caused increased LDH activity proportionally to the tested concentrations.
This work was supported by VEGA No.1/4305/07.

P9

Phototoxic effect and photochemical properties of ethyl 1,4-dihydro-8-nitro-4-oxoquinoline-3-carboxylate

Jantová S., Brezová V., Miko M., Koňariková K., Vrecková Z., Milata V.
Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, FCHPT STU Bratislava; Ústav fyzikálnej chémie a chemickej fyziky FCHPT STU Bratislava; Ústav organickej chémie, katalýzy a petrochémie FCHPTU STU Bratislava
milan.miko@stuba.sk

1,4-Dihydro-4-oxoquinoline derivatives (quinolones) represent one of the largest classes of biological active agents, frequently used in the medical practice. With the aim to find new anticancer active compounds, 13 novel quinolones were synthesized and examined for cytotoxic activities. The results demonstrated that 1,4-dihydro-8-nitro-4-oxoquinoline-3-carboxylate (Q5) possesses the highest cytotoxic activity on leukemia cell lines (murine leukemia L1210 and human leukemia HL60 cells). The Q5 cytotoxicity behaves in a dose- and time-dependent manner and increased upon UVA irradiation. The positive effect of UVA exposure on cytotoxicity was explained by reactive oxygen species generation upon photoexcitation of Q5 molecule in the presence of oxygen. Electron paramagnetic resonance spectra measured upon irradiation of aerated solutions of Q5 in dimethylsulfoxide confirmed Q5 ability to generate super-oxide anion radicals and singlet oxygen. The results are in accordance with UVA excitation of Q5 coupled with electron or energy transfer to molecular oxygen.

ACKNOWLEDGMENT
This study was supported by Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic (Projects VEGA 1/4305/07, 1/0225/08 and VEGA 1/3579/06) and Research and Development Agency of the Slovak Republic (contract No. APVV 0055-07).

P10

Bacterial isolates from polluted environment exhibiting catalase and peroxidase activity

Bučková M., Godočíková J., Zámocký M., Polek B.
Institute of Molecular Biology, SK-84551 Bratislava; University of Natural Resources and Applied Life Sciences, A-1190, Vienna
maria.buckova@savba.sk

Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of Phase II detoxification enzymes. They catalyse the conjugation of glutathione (GSH) to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds including chemical carcinogens. The soluble GSH conjugates are susceptible to detoxification and elimination. The GSTs play an important role in anti-cancer defence. We have studied distribution and the level of expression of GSTs in cancer cell lines.
GSTs were purified from three cell lines (EM-G3, MCF7, HCC) derived from breast cancer cells and one cell line (HeG2) derived from liver cancer cells using affinity chromatography on GSH Sepharose 4B. Quantity and representation of proteins interacting with GSH was studied by two-dimensional gel electrophoresis. The proteins were identified by mass spectrometry.

P11

Úloha izoforiem selenoenzýmu jódtyronídejodázy v mechanizme účinku 3,5,3'- trijód – L – tyronín na úrovni bunky: vplyv vybraných endogénnych a exogénnych faktorov na aktivitu enzýmu

Brtko J., Eybl V.
Laboratórium molekulárnej endokrinológie, Ústav experimentálnej endokrinológie Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika; Oddelenie farmakológie, Lekárska fakulta Karlovej univerzity v Plzni, Česká republika
julius.brtko@savba.sk

Za katalytický proces monodejodácie hormónov štítnej žľazy sú v tkanivách stavovcov zodpovedné tri selén obsahujúce izoenzýmy, jódtyronín-5´-dejodáza, typ I (5´-DI), jódtyronín-5´-dejodáza, typ II (5´-DII) a jódtyronín-5-dejodáza, typ III (5-DIII). Ich významnými úlohami v bunke cieľového tkaniva hormónu štítnej žľazy je na jednej strane snaha zabezpečiť pre jadrový receptor hormónu štítnej žľazy (transkripčný faktor indukovateľný 3,5,3´-trijód-L-tyronínom) optimálnu koncentráciu 3,5,3´-trijódtyronínu (T3), avšak na druhej strane aj inaktivovať nadbytočnú koncentráciu L-tyroxínu, T3 a ich degradačných produktov v organizme. Na rozdiel od 5´-DII a 5-DIII, jedine aktivita 5´-DI je inhibovateľná nízkymi koncentráciami 6-n-propyl-2-tiouracilu (PTU), ktorý vytvára s oxidovanou formou 5´-DI stabilný selenosulfid. Takto uvedené tri izoformy jódtyronín dejodázy majú na úrovni bunky nenahraditeľnú úlohu „strážcov" biologického účinku hormónov štítnej žľazy.
Naše výsledky in vivo experimentov ukázali, že rôzne endogénne ako aj exogénne faktory, napr. vplyv rôznych anorganických polutantov životného prostredia môžu významne ovplyvňovať aktivitu 5´-DI v pečeni potkana. Obdobne sme zistili, že aj imunitná odpoveď organizmu vyvolaná prítomnosťou cudzorodého antigénu alebo i rôznym spôsobom experimentálne vyvolaná záťaž organizmu môžu významným spôsobom ovplyvniť aktivitu 5´-DI a tým aj metabolizmus hormónov štítnej žľazy v pečeni experimentálnych zvierat.
Ďalej sme zistili sme, že u toxických adenómov štítnej žľazy sa nachádza vyššia a u studených uzlov štítnej žľazy nižšia aktivita enzýmu 5´-DI v porovnaní s normálnym tkanivom tej istej štítnej žľazy pacienta, čo naznačuje na zmenu enzymatického systému zabezpečujúceho v bunke štítnej žľazy monodejodáciu L-tyroxínu na biologicky aktívny hormón štítnej žľazy 3,5,3´-trijód-L-tyronín.
Táto práca sa uskutočnila za podpory grantu VEGA č. 2/0022/08, grantu GAČR č. 305/05/0344 a grantu Ministerstva školstva ČR č. MSM 002160819.

P12

Overexpresia P-glykoproteínu v L1210/VCR je asociovaná so zmenami endoplazmatického retikula

Šereš M., Poláková E., Križanová O., Šírová M., Breier A., Sulová Z.
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV Bratislava
mario.seres@savba.sk

Myšia leukemická bunková línia L1210/VCR (R), ktorej multidrug rezistencia je sprostredkovaná P-glykoproteínom (Pgp), je menej citlivá na tapsigargín (inhibítor vápnikovej pumpy (SERCA) endoplazmatického retikula (ER)) ako parentálna senzitívna línia L1210 (S). Súčasne sme v R bunkách detegovali nižšiu hladinu mRNA pre SERCA 2 ako v S bunkách, tento pokles bol ešte výraznejší, ak sa R bunky kultivovali v prítomnosti cytostatika vinkristínu (VCR). Množstvo mRNA kodujúcej obidva vápnik-uvolňujúce kanály, inozitol 1,4,5 trifosfátový receptor (IP3R) a ryanodínový receptor (RyR), bola rovnaká v S a R bunkách. Kultivácia R buniek s VCR potlačila expresiu mRNA pre IP3R, ale neovlyvnila hladinu mRNA pre RyR. Na úrovni proteínu sme zistili vyššie hladiny kalnexínu (vápnik viažuci proteín, ktorý sa podieľa na maturácii Pgp v myších fibroblastoch (1)) v S bunkách v porovnaní s R bunkami, pričom pokles hladiny mRNA sme pozorovali len v prípade, že boli R bunky kultivované v prítomnosti VCR. Imunoprecipitáciou sme zistili asociáciu kalnexínu s nematurovaným Pgp. Rezistencia R buniek na tapsigargín a zmeny v expresii ďalších proteínov endoplazmatického retikula kontrolujúcich zásoby vápnika v ER naznačujú na zmeny v homeostáze vápnika v R bunkách v porovnaní so S bunkami. V našej leukemickej línii L1210/VCR je maturácia Pgp asociovaná s kalnexínom.
Táto práca bola podporená: APVT-51-027404, VEGA- 2/7122/7 a VEGA 2/080/26.

1. Loo W, Clarke DM: J. Biol. Chem. 269 1994.

P13
Modulation of cadherin- and catenin-mediated intercellular junctions by toxic AhR ligands

Zatloukalová J., Machala M., Vondráček J.
Institute of Biophysics AS CR, Brno; Veterinary Research Institute, Brno
iris@ibp.cz

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) are toxic environmental pollutants, which exert their multiple toxic effects primarily by aryl hydrocarbon receptor (AhR), a transcription factor, which is involved in the regulation of e.g. cell proliferation, cell cycle progression, differentiation and senescence. TCDD and PCB126 are both strong tumor promoters and animal exposure has been shown to be accompanied with a development of procarcinogenic changes in various organs, such as liver or lung. As the process of tumor promotion is tightly associated with the loss of contact inhibition, we examined effects of TCDD or PCB126 on contact-inhibited WB-F344 cells, and we focused on the description of changes in expression and localization patterns of E-cadherin, beta-catenin and plakoglobin, proteins playing a crucial role in cell-to-cell communication. Both TCDD and PCB126 induced a decrease of beta-catenin, E-cadherin and plakoglobin protein levels, downregulation of plakoglobin mRNA level, but not beta-catenin mRNA level, and induced a different localization pattern of both catenins. Moreover, siRNA and chromatin immunoprecipitation assays have revealed a possible role of AhR in regulation of plakoglobin transcription and expression. Taken together, these data strongly suggest that AhR might play a significant role in modulation of cell-to-cell communication and contact inhibition, the processes deregulated during tumor promotion.
(This work was supported by the Czech Science Foundation project no. 524/06/0517).

P14
Role of cytochromes P450 in metabolic activation of benzo[a]pyrene and ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse

Moserová M., Arlt V. M., Phillips D. H., Kotrbová V., Henderson C. J., Frei E., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 40, Prague; Section of Molecular Carcinogenesis, Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom; Cancer Research UK Molecular Pharmacology Unit, Biomedical Research Centre, Dundee DD1 9SY, United Kingdom; Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany
moserova@seznam.cz

Many studies using mammalian cellular and subcellular systems have demonstrated that benzo[a]pyrene (BaP) and anticancer drug ellipticine are metabolically activated by cytochrome P450s (CYPs). In order to evaluate the role of hepatic versus extra-hepatic metabolism of BaP and ellipticine we used the HRN (Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null) mouse model, in which cytochrome P450 oxidoreductase (POR), the unique electron donor to CYP enzymes, is deleted specifically in hepatocytes, resulting in the loss of essentially all hepatic CYP function. HRN and wild-type (WT) mice were treated i.p. with 125 mg/kg body weight BaP daily for up to 5 days and with 10 mg/kg body weight ellipticine in a single dose. DNA adduct levels formed by both compounds were measured by 32P-postlabelling analysis with structural confirmation of the formation of 10-(deoxyguanosin-N2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (dG-N2-BPDE) by LC-MS/MS analysis. Hepatic microsomes isolated from BaP-treated and untreated mice were also incubated with BaP or ellipticine and DNA in vitro. BaP- and ellipticine-DNA adduct formation was up to 7-fold lower with the microsomes from HRN mice than with those from WT mice. Most of the hepatic microsomal activation of BaP in vitro was attributable to CYP1A and to the same enzyme and CYP3A for ellipticine. Using HPLC, patterns of BaP and ellipticine metabolites generated by hepatic microsomes were also identified. Our results reveal that ellipticine metabolism and DNA adduct formation in vitro correspond well to levels of DNA adducts in vivo in the HRN mouse model used in the study. On the contrary, they also reveal an apparent paradox, whereby CYP enzymes appear to be more important for detoxification of BaP in vivo, despite being involved in its metabolic activation in vitro.

Supported by GACR (203/06/0329) and Czech Ministry of Education (MSM0021620808. 1M0505).

P15
Preparation of apo-cytochrome b5 utilizing different methods and approaches

Mrázová B., Kotrbová V., Marešová M., Martínek V., Martínková M., Frei E., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg
barunka.mrazova@seznam.cz

Cytochrome b5 (b5), a component of endoplasmic reticulum membrane, is a heme protein with molecular weight of 16 800. It is composed of two functional domains, a soluble heme-containing core, and a short hydrophobic C-terminal tail, which anchors the protein into the microsomal membrane. Cytochrome b5 has been shown to stimulate, inhibit or have no effect on cytochrome P450 (CYP)-mediated reactions. There are two major theories explaining this effect: (i) direct electron transfer from b5 to CYPs and (ii) conformational effects in the absence of electron transfer. Recently, we found that b5 isolated from rabbit liver microsomes and reconstituted with CYP1A1/2 and NADPH:CYP reductase modulates the oxidation of anticancer drug ellipticine. To elucidate b5 modulation mechanism it is neccessary to evaluate not only the effect of its native molecule, but also the effect of the apo-b5, on ellipticine oxidation. In order to prepare the pure apo-b5, the heme cofactor has to be gently and efficiently removed without altering the native protein conformation. We used several different approaches. The first one was chemical extraction of heme from purified rabbit b5 by acid acetone. Majority of protein was regrettably denaturated after this procedure, thereby we utilized a heterologous expression of apo-b5 in E.Coli BL-21 (DE3) Gold cells. Cytochrome b5, produced predominantly as the apo-form was isolated from purified membranes. The apo-b5 reconstituted with heme reveals the same oxidized and reduced absorbance spectrum as native b5 and was found to be reduced also with NADPH:CYP reductase. We tried also displacement of heme by another protein eliciting high affinity toward the heme – the apo-myoglobin from the equine skeletal muscle. Moreover, we employed a heterologous expressed mutant of myoglobin (SWMb_H64Y/V68F), which has even higher affinity to heme than the wild type protein.
Supported by GACR (203/06/0329) and the Czech Ministry of education (MSM 0021620808)

P16
Modulation of CYP1A1/2-mediated biotransformation of anticancer drug ellipticine by cytochrome b5

Kotrbová V., Mrázová B., Háčková M., Frei E., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg
verakotrbova@centrum.cz

Ellipticine is an alkaloid exhibiting significant antineoplastic and anti-HIV activities. The mechanism of ellipticine anticancer action is considered to be based mainly on DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II. Recently, we found that ellipticine also forms DNA adducts in vitro and in vivo. The formation of the major DNA adduct is dependent on the activation of ellipticine by cytochromes P450 (CYP). Cytochrome b5 (b5), another microsomal protein, has been shown to stimulate, inhibit or have no effect on CYP-mediated reactions. Two major explanations are direct electron transfer from b5 and conformational effect in the absence of electron transfer.Here we describe metabolism of ellipticine catalyzed by the CYP-reconstituted system containing CYP1A1/2 and NADPH:CYP reductase in the presence and/or absence of b5. Up to five metabolites are generated by CYP1A1/2; 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticine and the ellipticine N2-oxide. The patterns and amounts of ellipticine metabolites varied significantly when b5 was present in the incubations. 7-hydroxy- and 9-hydroxyellipticine formation was decreased, while generation of 13-hydroxy- and 12-hydroxyellipticine, the metabolites responsible for formation of the major DNA adducts found in vivo in DNA of several tissues of rats exposed to ellipticine, was increased significantly. Other proteins with or without heme in their molecules were without such effects. Different kinetics of ellipticine oxidation by the reconstituted enzyme systems with or without b5 was found. While, in the CYP1A1-reconstituted system in the presence of b5 the values of Hill coefficients increase to values close to 2, no cooperativity was observed in other systems. Furthermore, we realized that b5 and liposomes decreased the affinity of ellipticine as a ligand towards CYP1A1, whereas NADPH:CYP reductase has the opposite effect.
Supported by GACR (203/06/0329) and the Czech Ministry of education (MSM 0021620808)

P17
Ellipticine induces cytochromes P450 1A1, 1B1 and 3A in target and non-target tissues

Aimova D., Poljakova J., Frei E., Stiborova M.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague; Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Heidelberg
aimova@seznam.cz

Ellipticine and some of its more soluble derivatives exhibit significant antitumor and anti-HIV activities. Besides the DNA intercalation and topoisomerase II inhibition, ellipticine exhibits also an enzymatically dependent mode of action, namely covalent modification of DNA. Among human cytochromes P450 (CYPs), CYP3A4, 1A1 and 1B1 were identified as the most efficient enzymes activating ellipticine. These enzymes are expressed in tumors sensitive to ellipticine, i.e. breast cancer. The role of CYP1A-mediated activation of ellipticine was found both in vitro, using the isolated enzyme, and in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. Treatment of MCF-7 cells with 3-methylcholanthrene led to elevated expression of CYP1A, resulting in enhanced sensitivity to ellipticine. Likewise, adriamycin-resistant MCF-7 cells, possessing multi-drug resistance phenotype associated also with decreased expression and inducibility of CYP1A, exhibit cross-resistance to ellipticine.
Here, an increase in CYP1A1, 1B1 and 3A4 protein levels was found in MCF-7 cells treated with ellipticine. Beside this human breast cancer cell line, we evaluated the potential of ellipticine to induce rat CYP orthologs in various tissues in vivo. Rat model was selected on the basis of previous studies, which identified rat microsomal enzymatic system as the most suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. Ellipticine was found to raise CYP1A mRNA/protein levels and enzymatic activities in livers, lungs and kidneys of rats treated i.p. with ellipticine. CYP3A1 expression and activity were stimulated in female but not male rat liver. Both in human and in rat model systems, CYP induction enhances the ellipticine-mediated DNA adduct formation. Taken together, these results show that via inducing CYP enzymes, ellipticine modulates to some extent its own pharmacological and/or genotoxic efficiency.

Supported by GACR (203/06/0329) and Czech Ministry of Education (MSM0021620808).

P18
Role of cytochrome P450 in detoxication of carcinogenic aristolochic acid

Šístková J., Frei E., Schmeiser H. H., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg
sistkova.jana@seznam.cz

Aristolochic acid (AA), the plant extract of Aristolochia species, was recently proven to be associated with the development of aristolochic acid nephropathy (AAN), which is characterized by chronic renal failure, tubulointerstitial fibrosis and urothelial cancer. AA may also cause a similar type of kidney fibrosis with malignant transformation of the urothelium, the Balkan endemic nephropathy (BEN). One of the common features of AAN and BEN is that not all individuals exposed to AA suffer from nephropathy and tumor development. We have suggested earlier that one cause for these different responses may be individual differences in the activities of the enzymes catalyzing the detoxication and/or activation of AA. While the enzymes activating the major component of AA, AAI, in vitro have already been identified, those participating in AAI detoxication both in vitro and in vivo have not yet been investigated in details. In this study we investigated the detoxication of AAI, namely its demethylation to aristolochic acid Ia (AAIa). We found that human, rat and mouse hepatic microsomes oxidize AAI to AAIa. HPLC was used to separate this metabolite from AAI, being eluted at retention time of 28.5 min as an individual product peak. To define the role of microsomal cytochrome P450 (CYP) enzymes in AAI oxidation, we investigated the modulation of this reaction by specific inducers and selective inhibitors of these enzymes. Furthermore, we also used microsomes of Baculovirus transfected insect cells containing recombinant human CYPs and NADPH:CYP reductase (SupersomesTM). The results of this study demonstrate a major role of CYP1A1 and 1A2 in AAI demethylation in vitro. However, the relative contribution of CYP enzymes detoxicating AAI in vivo remains still to be resolved.

P19

Oxidation of carcinogenic 2-nitroanisole and it´s metabolite 2-nitrophenol by cytochromes P450

Svobodová M., Dračínská H., Martínková M., Frei E., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague; Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, In Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg
svobodova.mar@seznam.cz

2-Nitroanisole (2-NA) is an important industrial pollutant. It is used primarily as a precursor in the synthesis of o-anisidine, an intermediate in the manufacture of many azo dyes. 2-NA exhibits carcinogenic activity, causing neoplastic transformation in the urinary bladder, spleen, liver and kidneys in rodents. 2-NA is oxidized by rat, rabbit and human hepatic microsomes to 2-nitrophenol (2-NP), 2,5-dihydroxynitrobenzene (2,5-DNB) and 2,6-dihydroxynitrobenzene (2,6-DNB). 2-NP is the major metabolite generated by rabbit and rat microsomes, but 2,5-DNB is the predominant product formed in human microsomes. Therefore, hepatic microsomal P450 enzymes participate in detoxication of this environmental carcinogen. Here, we show that one of the 2-NA metabolites, 2-NP, is metabolized by rat microsomes to 2,5-DNB. Treating rats with an inducer of CYPs of a 2B subfamily (phenobarbital) leads to an increase in 2-NP oxidation, while that with pregnenolone-16α-carbonitrile and ß-naphoflavone had lower effects. Most of inhibitors of individual CYPs tested in this study, α-naphtoflavone (α-NF for CYP1A), diamantane (DIA for CYP2B), sulfaphenazole (SULPH for CYP2C), quinidine (QUI for CYP2D), diethyldithiocarbamate (DDTC for CYP2E1) and ketoconazole (KETO for CYP3A) influenced the 2-NP metabolism. DDTC, CHIN, KETO, DIA inhibit generation of 2,5-DNB, whereas α-NF and SULPH were almost without this effect. Using microsomes of Baculovirus transfected insect cells containing recombinant human or rat CYPs and NADPH:CYP reductase (Supersomes) we found that human CYP2E1 followed by CYP2B6, 2A6 and 3A4 were the most effective in 2-NP oxidation, while CYP2E1 followed by CYP2C11, 1A1, 2B1 were the most efficient rat enzymes metabolizing 2-NP to 2,5-DNB. Results are interpreted from the point of view of individuals' susceptibility to carcinogenic 2-NA and its metabolites.
Supported by Grant Agency of Czech Republic (grant 203/06/0329) and the Czech Ministry of Education (MSM 0021620808).

P20

Cytochromes P450 and peroxidases oxidize 3-aminobenzanthrone, the human metabolite of carcinogenic 3-nitrobenzanthrone

Mizerovská J., Dračínská H., Arlt V.M., Schmeiser H.H., Frei E., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; Section of Molecular Carcinogenesis, Institute of Cancer Research, Brookes Lawley Building, Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom; Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg
janna.mizerovska@seznam.cz

The aromatic compound 3-nitrobenzanthrone (3-NBA) is one of the most potent mutagens and suspected human carcinogen identified in diesel exhaust, ambient air particulate matter, in surface soil and rainwater. The major metabolite of 3-NBA, 3-aminobenzanthrone (3-ABA), was recently detected in the urine of smoking and nonsmoking salt mining workers occupationally exposed to diesel emissions, demonstrating that exposure to 3-NBA can be significant and is detectable. Here, we study the metabolism of 3-ABA in vitro, in order to characterize the 3-ABA metabolites as well as cytochromes P450 responsible for their formation. We recently showed that principal enzymes forming DNA adducts from 3-ABA in livers are cytochromes P450 (CYP), especially CYP1A1 and 1A2. Oxidation of 3-ABA was studied using Supersomes, microsomes derived from baculovirus infected insect cells, containing human and rat recombinant CYP enzymes. Cytochromes P450 of both species oxidize 3-ABA up to three metabolites. These metabolites were separated by HPLC as distinguish product peaks. Using co-chromatography with synthetic standards, two of them were identified to be oxidative metabolites of 3-ABA, N-hydroxy-3-ABA and 3-NBA. Structure of third metabolite, eluted with the retention time of 18 minutes, remains to be characterized. 3-ABA is also oxidized by peroxidases. We compare the efficiencies of three peroxidases, horseradish peroxidase (HRP), lactoperoxidase (LPO) and myeloperoxidase (MPO). The highest efficiency to oxidize 3-ABA was detected with HRP, followed by MPO and LPO. These results indicated the influence of several types of CYPs to 3-ABA oxidation.
Supported by GACR (203/06/0329) and the Czech Ministry of Education (MSM 0021620808).

P21
Study on mechanism of action of ellipticine on neuroblastoma cells

Poljaková J., Hřebačková J., Hraběta J., Eckschlager T., Frei E., Stiborová M.
Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2; Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Medical School Motol, Charles University, 150 00 Prague 5; Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg
Jitka.Poljakova@seznam.cz

High-risk neuroblastoma is the most frequent solid extra-cranial tumor in children and is a major cause of death from neoplasia in infancy. Ellipticines are plant alkaloids with an antineoplastic activity. The mode of action is based mainly on DNA intercalation, inhibition of topoisomerase II and formation of covalent DNA adducts mediated by cytochromes P450 (CYP) and peroxidases. Such ellipticine-DNA-adducts are formed in vitro, in human breast adenocarcinoma MCF-7, leukemia HL-60 and CCRF-CEM cell lines and in vivo in rats exposed to ellipticine. Here, the cytotoxicity of ellipticine to human neuroblastoma cell lines IMR-32, UKF-NB-3, UKF-NB-4 and UKF-NB-4 (elli) (the cell line possessing a partial resistance to ellipticine) was investigated. Furthermore, the effect of hypoxic conditions and/or valproate (VPA) on the ellipticine toxicity to these cells was also examined.
The toxicity of ellipticine to neuroblastoma cells cultivated under the standard conditions was higher than that to the cell lines grown under hypoxia (1% oxygen). Ellipticine-DNA adducts were detected in all neuroblastoma cells. Hypoxia mediated a decrease in toxicity of ellipticine to these cells. Such a lower sensitivity to ellipticine correlates with a decrease in the formation of ellipticine-derived DNA adducts. The pretreatment of neuroblastoma cells with inhibitor of histone deacetylase, VPA, produces an increase in the cytotoxicity of ellipticine to these cells. Such a higher sensitivity to ellipticine correlated with an increase in ellipticine-derived DNA adduct formation. In vitro studies evaluating the effect of VPA on DNA adduct formation by ellipticine and its CYP and peroxidase-mediated oxidation suggest that one explanation for effects of on cancer cells might follow from their ability to make cell DNA more accessible to ellipticine.

Supported by GACR (203/06/0329), IGA (NR9522-3/2007) and Czech Ministry of Education (MSM0021620813).

P22
Diet flavonoids inhibit specific aldo-keto reductase AKR1C3

Živná L., Škarydová L., Wsól V.
Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University Hradec Králové
lucie.zivna@faf.cuni.cz

AKR1C3 (also known as 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5) is a monomeric cytosolic enzyme which katalyses conversion at the 3alpha-, 17beta- and the 20alpha-position of estrogens, androgens and progestins. One of its substrates is a prospective anticancer drug Oracin,
6-[2-(2-hydroxyethyl)-aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c]isoquinoline, presently in Phase II of clinical trials. It is metabolised in reductive way to dihydrooracin. Very potent inhibitors of AKR1C3 are the non-steroidal anti-inflammatory drugs, e.g. indomethacin.
Flavonoids are diphenolic substances with structural similarity to human steroid hormones. They can be found in almost all plant families in leaves, stems, roots, flowers and seets. Most of them are present as glycosides in plants, but only the aglycones exert estrogen- like activities. We tried to find out if AKR1C3 is inhibited by flavonoids commonly occurring in the diet.
AKR1C3 was incubated with 5mM oracin and an NADPH regenerating system. The reaction was inhibited by addition of various flavonoids dituled in mixture of water and methanol in concentrations between 10nM and 20ĶM. The reductive activity was measured by HPLC quantification of total amount of the metabolite dihydrooracin. Inhibitory effect of flavonoids was characterised by IC50 values, determined by the GraphPadPrism 5 programme.
The highest inhibitory effect was displayed by the flavonoids 2-hydroxyflavanone and 7-hydroxyflavone which occur in red and yellow fruits and vegetables, and by naringenin from citrus fruits. Our results show that AKR1C3 can be a potential target for the inhibitory effect of flavonoids.
This project was supported by Grant Agency of Charles University, Grant No 108/2006/C.

P23
Import antihelmintik a jejich vliv na aktivitu biotransformačních enzymů motolice kopinaté

Szotáková B., Lamka J., Dokoupilová I., Hradecká A., Skálová L.
Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, Hradec Králové
barbora.szotakova@faf.cuni.cz

Dikrocelióza, helmintóza způsobená motolicí kopinatou (Dicrocoelium dendriticum), i přes její dlouhodobé studium představuje spolu s ostatními trematodózami stále ne zcela poznanou problematiku. Pro celou skupinu trematodóz platí, že plně využitelných léčivých látek je jen velmi málo a léčiva opakovaným podáním zvířatům mohou ztratit účinnost v důsledku vývoje helmintorezistence. Jediným zatím všeobecně přijatelným prostředkem v boji s motolicí kopinatou je farmakoterapie a farmakoprofylaxe prováděná v ohrožených či napadených chovech s využitím vhodných anthelmintik. Ze spektra dostupných antitrematod jsou upřednostňována benzimidazolová anthelmintika (např. albendazol). Cílem bylo sledovat prostup anthelmintik do motolic a jejich vliv na biotransformační enzymy parazita. Živé motolice byly kultivovány ve sterilních plastových mikrozkumavkách v živném médiu RPMI s přídavkem albendazolu nebo albendazol sulfoxidu o koncentraci 5 mikroM a 10 mikroM. Transport parentní látky a metabolitů byl sledován pomocí jejich kvantifikace v těle motolic a v kultivačním médiu (v závislosti na délce inkubace a koncentraci látky) s využitím HPLC analýzy. Ovlivnění aktivity biotransformačních enzymů albendazolem a albendazol sulfoxidem bylo sledováno v subcelulárních frakcích (mikrosomální, mitochondriální, cytosolická) připravených z motolic inkubovaných s těmito anthelmintiky. Jak parentní látka albendazol, tak jeho metabolit albendazol sulfoxid do těla motolic prostupují, intenzita difúze závisí na době kontaktu motolic s anthelmintikem i na koncentraci podaného anthelmintika. Albendazol je motolicemi přeměňován na albendazol sulfoxid (vykazuje anthelmintickou aktivitu), další oxidační produkt – neaktivní albendazol sulfon u motolic nevzniká. Tímto mechanismem se pravděpodobně motolice nemohou bránit toxickému účinku albendazolu a albendazol sulfoxidu.

Podporováno Grantovou agenturou České republiky, Grant č. 524/07/0611.

P24
Modulace hladin ceramidu a sfingomyelinu v jaterních epiteliálních buňkách potkana po expozici 2,3,7,8 – tetrachlordibenzo – p – dioxinem a 2,2´, 4,4´, 5,5´- hexachlorbifenylem

Pěnčíková K., Slavík J., Vondráček J., Machala M.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno; Biofyzikální ústav AV ČR, Brno
pencikova@vri.cz

Sfingolipidy jsou významnou složkou buněčných membrán a podílejí se na lipidní signální transdukci, která může přispívat k regulaci buněčného růstu, apoptózy či diferenciace. 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) je silný karcinogen působící jako agonista Ah receptoru, zatímco 2,2‘,4,4‘,5,5‘-hexachlorbifenyl (PCB 153) je nádorový promotor, jehož mechanismy toxicity nejsou zatím zcela charakterizovány. Účinky těchto perzistentních látek, znečišťujících životní prostředí, na metabolismus sfingolipidů nejsou dosud známy. V rámci této práce jsme studovali vliv TCDD a PCB 153 na hladinu metabolitů a aktivitu enzymů ceramid/sfingomyelinové dráhy v epiteliální buněčné lini WB-F344 odvozené od jaterních progenitorových buněk potkana. Mezi nejvýznamnější pozorované efekty patří zvýšení hladiny ceramidu po 24hod expozici TCDD a signifikantní snížení hladiny sfingomyelinu po expozici PCB 153. Obě tyto látky snižovaly aktivitu neutrální sfingomyelinázy, především po krátké expozici do 60 min. Ze získaných dat je zřejmé, že oba toxikanty působí komplexní změny hladin lipidních signálních molekul (jak rychlou modulaci enzymových aktivit, tak dlouhodobé efekty), které by mohly následně ovlivnit buněčnou proliferaci/apoptózu, diferenciaci a mezibuněčnou komunikaci, tedy děje, které souvisejí s nádorovou promocí. Tato práce pomáhá otevírat novou oblast biochemického studia účinků cizorodých látek – poznání jejich interakcí s lipidy podílejícími se na vnitrobuněčné signalizaci.
[Tato práce byla podpořena GAČR (525/08/1590) a MZe ČR (MZe0002716201).]

P25
Identifikace toxických kontaminantů prostředí in vitro biotesty, LC-MS/MS a GC/MS

Vykopalová L., Pěnčíková K., Ciganek M., Neča J., Vondráček J., Brack W., Luebcke-Von Varel U., Machala M.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno; Biofyzikální ústav AV ČR, Brno; Umweltforschungszentrum, Leipzig, Německo
LVykopalova@seznam.cz

Pro identifikaci toxických organických látek v komplexních vzorcích životního prostředí lze využít tzv. „effect-directed analysis“ (EDA), která je založena na postupné chromatografické frakcionaci extraktů vzorků, stanovení toxických potencí frakcí pomocí testů detekujících specifické mechanismy toxicity in vitro, a následné identifikaci aktivních sloučenin metodami LC-MS/MS a GC/MS. Aromatické kontaminanty prostředí vykazují řadu toxických účinků včetně disrupce endokrinních a vývojových procesů. Významnou roli zde hrají především transaktivace „dioxinového“ cytosolového receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR), která vede k souboru efektů označovaných jako dioxinová toxicita, a jaderných steroidních receptorů, jakými jsou např. estrogenní receptory (ER). V rámci této studii byly identifikovány polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty zodpovědné za dioxinovou toxicitu vzorků říčních sedimentů. Dioxinová toxicita, zprostředkovaná aktivací AhR, byla měřena metodou DR-CALUX. Byly také částečně identifikovány polární aromatické sloučeniny, které vykazovaly estrogenní aktivitu v testu ER-CALUX. Podstatný příspěvek k celkové estrogenní aktivitě měly především endogenní estrogenní hormony detekované v environmentálních vzorcích, především estron, zatímco některé průmyslové kontaminanty (dialkylestery kyseliny ftalové aj.), a stanoly přírodního původu hrály minoritní úlohu. [Práce podpořena GAČR, projekt č. 525/08/1590]

P26
Alveolar type II epithelial cells as a model for studying genotoxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons under proinflammatory conditions

Umannová L., Krčmář P., Machala M., Kozubík A., Vondráček J.
Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR Brno; Veterinary Research Institute Brno
umi@ibp.cz

The RLE-6TN (rat lung epithelial-T-antigen negative) cell line was derived from alveolar type II cells from male F344 rat (Driscoll et al. 1995). Persistent exposure of respiratory epithelial cells to environmental pollutants induces the expression of proinflammatory mediators that can lead to chronic inflammation and contribute to lung damage (Espinoza et al. 2006). In the present study, we analyzed interactive effects of B[a]P and proinflammatory cytokine TNF-alpha on expression of AhR and its target genes and related effects that can lead to formation of genotoxic metabolites. We have recently found that TNF-alpha can differentially modulate expression of CYP1B1/1A1 in rat liver epithelial cells (Umannova et al. 2007), and that it can potentiate genotoxic effects of important environmental pollutant benzo[a]pyrene through upregulation of CYP1B1 expression (Umannova et al. 2008). However, nothing is currently known about interactions of proinflamatory cytokines with PAHs and the possible role of these interactions in regulation of xenobiotic-metabolizing enzymes (CYP1A1/1B1) in lung. In addition, we also examined other enzymes related with metabolism of xenobiotics (AKR1C9) and/or inflammation (COX2, iNOS), as well as the effects related to DNA damage, such as accumulation and phosphorylation of p53 tumor suppressor and subsequent induction of apoptosis. The interactions of inflammatory mediators and PAHs might lead to increased genotoxic damage in RLE-6TN cells or contribute to non-genotoxic effects leading to e.g. tumor promotion. (This work was supported by the Czech Science Foundation project no. 524/06/0517).

Driscoll, K. E. et al. (1995). In Vitro Cell Dev Biol Anim 31(7): 516-27.
Espinoza, L. A. et al. (2006). Am J Respir Cell Mol Biol 35(4): 479-87.
Umannova, L. et al. (2008). Mutat Res 640(1-2): 162-9.
Umannova, L. et al. (2007). Toxicol Sci. 99(1): 79-89

P27
Biological activity of new fenamates with metal ion in the molecule

Krupková L., Olejníková P., Ondrušová Z., Kaliňáková B., Hudecová D.
Department of Biochemistry and Microbiology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 81237-Bratislava, Slovak Republic
lenka.krupkova@stuba.sk

Coordination compounds with a metal ion in the molecule are still in the center of interest of many biological, chemical and pharmacological sectors. This work presents the biological activity of metal complexes with composition of MX2 were M is the metal ion (Cu2+, Zn2+, Co2+), X is mefanate, flufenamate, meclofenamate, tolfemate. These bioactive ligands are used especially for treatment of some rheumatic diseases and complexes are classified as non steroid antiflogistics. The antimicrobial effect of new complexes was tested against G+ (Staphylococcus aureus) and G- (Escherichia coli) bacteria; yeasts (Candida albicans, C. parapsilosis) and filamentous fungi (Rhizopus oryzae, Alternaria alternata, Botritys cinerea, Microsporum gypseum, Trichophyton interdigitalis, Aspergillus fumigatus) and characterized by IC50 and MIC values. The highest antibacterial effect was observed in the presence of all meclofenamic complexes. S. aureus was more sensitive than E. coli. Co(meclof)2.(H2O) influenced the growth of both yeasts at the highest level. The most sensitive filamentous fungi were M. gypseum and B. cinerea. Based on Ames assay results, complexes demonstrated no mutagenic activity. The antioxidant activity (FRAP, TEAC assay) of these complexes was considerably lower than the activity of trolox standard. Some of new metalofenamates had a profound effect on biomembrane permeability. Influence on membrane permeability was observed as: an increase in antocyan efflux in Beta vulgaris var. rubra, hemolysis of red blood cells and changes of permeability of plasma membrane of C. albicas after incubation with the complexes.

This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA grant No.1/3251/06 and No.1/0462/08

P28
Aktivity biotransformačních enzymů vlasovek izolovaných z ovcí léčených subterapeutickými dávkami flubendazolu

Křížová V., Lamka J., Kubíček V., Škrtelová M.,Szotáková B., Skálová L.
Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové
skaloval@faf.cuni.cz

Vlasovka slézová (Haemonchus contortus) je červ parazitující v žaludku přežvýkavců. Infekce vlasovkou (haemonchóza) je celosvětově rozšířené onemocnění, které je příčinou zdravotních problémů a úhynu velkého počtu hospodářských i volně žijících zvířat. Jedinou dostupnou obranou je podávání anthelmintik. Situace se však v posledních letech komplikuje rostoucí rezistencí parazitů na běžná anthelmintika. V navození rezistence by mohly hrát určitou úlohu i biotransformační enzymy parazita, které jsou schopny detoxikovat anthelmintika.
Cílem studie bylo zjistit, zda kontaktem parazita se subterapeutickými (netoxickými) dávkami anthelmintika dochází k modulaci biotransformačních enzymů parazita. V chovatelském zařízení bylo 16 jehňat experimentálně infikováno larvami L3 vlasovky. Po šesti týdnech byla zvířata rozdělena do čtyř skupin: kontrolní (neléčené), léčené 3 x 1/15 terapeutické dávky flubendazolu, léčené 3 x 1/30 terapeutické dávky flubendazolu a léčené 3 x 1/60 terapeutické dávky flubendazolu. 24 hodin po poslední dávce byla zvířata utracena a z jejich slézů byli vyizolováni dospělci vlasovky. Z homogenátu červů byly připraveny subcelulární frakce, v kterých byly následně testovány aktivity vybraných biotransformačních enzymů a sledován in vitro metabolismus flubendazolu. Z výsledků vyplývá, že při kontaktu vlasovky s nízkou dávkou flubendazolu dochází ke zvýšení aktivit některých biotransformačních enzymů a k zrychlení deaktivace flubendazolu. Tento mechanismus může napomáhat rozvoji rezistence vlasovek.

Projekt je finančně podporován Grantovou agenturou České republiky (524/06/1345).

P29
Genotoxické a nádorově promoční účinky metylovaných benzo[a]pyrenů v jaterních epiteliálních buňkách potkana

Trilecová L., Marvanová S., Pěnčíková K., Krčmář P., Topinka J., Vondráček J., Machala M.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno; Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha; Biofyzikální ústav AV ČR, Brno
trilecova@vri.cz

Monometylované benzo[a]pyreny (MeBaP) patří mezi málo charakterizované deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků. Ke studiu genotoxických a nádorově promočních účinků těchto látek byly využity zavedené modely potkaních jaterních epiteliálních buněk WB-F344 a transgenní buněčná linie H4IIE:Gud.luc odvozená z hepatomu potkana. U vybraných MeBaP byla zjištěna silná aktivace AhR (aryl hydrocarbon receptor) a indukce cytochromů P450 1A1, 1B1 a aldoketoreduktázy AKR 1C9 metodami DR-CALUX, respektive real-time RT-PCR. Signifikantní genotoxická poškození byla stanovena měřením hladiny stabilních DNA aduktů metodou 32P-postlabeling; průtokovou cytometrií byla také detekována tvorba reaktivních forem kyslíku. Modulace buněčného cyklu, proliferace a apoptózy korespondovaly především s genotoxickými účinky MeBaP, které by mohly hrát významnou roli v prokarcinogenním působení MeBaP. Pro toxické potence individuálních derivátů je významná pozice metylové skupiny v molekule benzo[a]pyrenu. Z hlediska genotoxicity se nejsilnějšími jevily 1-MeBaP a 11-MeBaP, zatímco 1-MeBaP a také 3-MeBaP byly nejsilnějšími agonisty AhR.

[Tato práce byla podporována grantem MZe ČR, č. MZe0002716201.]

P30
Buněčný cyklus a apoptáza v buňkách adenokarcinomu prostaty LNCaP exponovaných genotoxickými polycyklickými aromatickými uhlovodíky

Hrubá E., Trilecová L., Marvanová S., Topinka J., Souček K., Vondráček J., Machala M.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně; Ústav experimentální medicíny AV ČR v Praze; Biofyzikální ústav AV ČR v Brně
xHrubaE@seznam.cz

V současné době je rakovina prostaty v České republice na druhém místě ve výskytu všech nádorových onemocnění u mužů. Epidemiologické výzkumy naznačují, že také environmentální genotoxiny, jako jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), by mohly přispívat ke vzniku nádorů prostaty.V této studii byly na buněčné linii LNCaP, modelu androgen-senzitivního adenokarcinomu prostaty, testovány silné genotoxiny ze skupiny PAU. Metodami kvantitativní real-time RT-PCR a Western blotting bylo ověřeno, že dibenzo[a,l]pyren a především benzo[a]pyren indukují prostřednictvím cytosolového receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR) genovou a proteinovou expresi biotransformačních enzymů CYP1A1 a CYP1B1. Metoda 32P-postlabelling prokázala signifikantní tvorbu aduktů reaktivních intermediátů PAU s DNA. Přesto nebyla u těchto buněk pozorována indukce apoptózy (fragmentace buněčných jader), ani modulace buněčného cyklu, jaká byla způsobena např. roskovitinem (inhibitorem cyklin-dependentních kináz) nebo UV zářením. Naším cílem bylo proto dále charakterizovat hladiny a fosforylaci některých proteinů zapojených v signálních drahách vedoucích od detekce poškození DNA k zástavě cyklu v jeho kontrolních bodech a/nebo k apoptóze (ATM, Chk1, Chk2, Cdc25A, p53), s cílem ověřit funkčnost těchto drah po působení genotoxických PAU v buňkách LNCaP.

[Práce byla podpořena grantem GAČR č. 310/07/0961.]

P31
Ion-exchange chromatography as a tool for purification of membrane-bound carbonyl reductases

Škarydová L., Živná L., Hubálek M., Wsól V.
Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic; Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové, Czech Republic
lucie.skarydova@faf.cuni.cz

Carbonyl reductases are responsible for metabolism of many eobiotics and xenobiotics. It can be grouped into two distinct protein superfamily: SDR (short-chain dehydrogenace/reductase) and AKR (aldo-keto reductase). We purify and identify microsomal carbonyl reductases from human liver which display reducing activity aganist oracin. Oracin is one of the prospective anticancer drugs. It is pro-chiral drug and is reduced to two enantiomers of dihydrooracin (DHO). Purified human 11beta-hydroxysteroid dehydrogrenase 1 (11beta-HSD1) catalyze conversion of oracin into DHO in stereospecific manner (76% (-)-DHO). From previous experiments is known that another enzyme participates in biotransformation of oracin but with inverse stereospecifity than 11beta-HSD1.
Purification protocol consists of several step. First it was necessary to solubilize microsomes from human liver. Solubilized microsomes were desalted by HiTrap Desalting column. The sample was applied onto different types of ion-exchange chromatogramy columns – HiTrap SP FF and Hi Trap Q FF. The reductive activity was determined by HPLC quantification of DHO after incubation of each enzyme fraction with oracin in the presence of NADPH generating system. Stereospecifity of DHO formation was measured by chiral HPLC method. The most active fractions were tested by SDS and native PAGE electrophoresis. The native PAGE gel slices were stained with Coomassie blue and for reductive activity with p-iodonitrotetrazolium and Meldola´s Blue and analyzed by MALDI TOF TOF. All purification steps were carried out at 4-8°C.
Using various separation techniques we purified enzymes from human liver microsomal fraction which displays reduction activity against oracin. Results are surprising and bring new view on function of some enzymes. It will be important to confirm their enzymatic activity by means of their recombinant forms.
This project was supported by Grant Agency of Czech Republic (GAČR 303/07/0994).

P32
Interakce 2,2',4,4',5,5'-hexachlórbifenylu (PCB 153) s membránově vázanými proteiny mezibuněčných spojení in vitro

Šimečková P., Zatloukalová J., Paděrová V., Krčmář P., Andrysík Z., Vondráček J., Machala M.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Biofyzikální ústav AV ČR, Brno
simeckova@vri.cz

PCB 153 je významný kontaminant životního prostředí a potravního řetězce. Mezi jeho známé toxické účinky patří např. neurotoxicita, endokrinní disrupce či nádorová promoce, přesné mechanismy jeho toxicity však nejsou zatím zcela objasněny. S využitím modelu potkaních jaterních epiteliálních buněk WB-F344, jsme studovali vliv PCB 153 na proteiny podílející se na tvorbě „mezerových" („gap junctions", GJ) a adherentních spojů, u nichž se předpokládá, že jejich disrupce hraje roli v nádorové promoci či v invazivitě nádorových buněk. Prokázali jsme, že PCB 153 snižoval jak hladinu konexinu 43, proteinu tvořící GJ, tak E-cadherinu, beta-kateninu a gama-kateninu, proteinů podílejících se na tvorbě adherentních spojů. PCB 153 také snižoval hladiny kaveolinu-1 a -2, proteinů lipidových raftů, což naznačuje možné účinky PCB 153 na funkce proteinů lokalizovaných v těchto membránových strukturách. Zvýšená degradace beta-kateninu může také vést ke změnám v regulaci exprese genů zprostředkované beta-kateninem. Hladiny či fosforylace proteinkináz regulujících degradaci beta-kateninu (Akt, GSK-3beta, ILK) však nebyly po expozici PCB 153 modulovány. Suprese beta-kateninu ale vedla ke snížení bazální genové exprese modelového genu regulovaného beta-kateninem, axinu-2. Naše výsledky mohou přispět k porozumění prokarcinogenních účinků PCB 153, které by mohly souviset s jeho dosud málo studovanými toxickými účinky na úrovni buněčných membrán a v mezibuněčné komunikaci.
[Podporováno GAČR, grant č. 524/07/0517, a MZe ČR, grant č. MZe0002716201.]

P33
Biodegradácia bromovaných derivátov fenolu

Uhnáková B., Martínková M., Petříčková A., Rázga M., Homolka L.
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i. Centrum Biotransformaccií a Biokatalýzy, Vídeňská 1083, Praha 4, 14220
brona@biomed.cas.cz

Bromované zlúčeniny sa používajú od roku 1978 miesto PCB (polychlorované bifenyly) ako spomaľovače horenia. BFR (brominated flame retardants) sa nachádzajú hlavne v elektrických a elektronických zariadeniach, osvetľovacích telesách, v podlahových krytinách, bytových textíliách, v baliacich a izolačných materiáloch. Tieto látky sú zle rozpustné a perzistentné. To znamená, že v materiáloch pretrvávajú a postupne sa z nich uvoľňujú počas doby životnosti, ale aj počas ich spracovávania ako odpadu. Ukladajú sa v organizme, v pôde a vodných sedimentoch, kde len ťažko podliehajú biodegradácii. Tetrabromobisfenol A (TBBPA) a 2,4,6-tribromofenol (TBP) momentálne dominujú ako spomaľovače horenia, mono- a dibromfenoly sú detegované ako produkty biodegradácie. Tieto látky predstavujú riziko pre životné prostredie a človeka. V tejto práci sme zistili, že drevokazné huby (Trametes versicolor, Pleurotus ostreatus) sú schopné bromované aromatické látky odbúravať. Vo filtráte média s obsahom bromovaných látok z kultivácie T. versicolor sme stanovili aktivitu extra celulárnych oxidáz (lakáza, Mn-peroxidáza), ktoré sa pravdepodobne na odbúravaní týchto zlúčenín podieľajú. Biodegradáciu bromovaných aromátov sme porovnávali v experimente s komerčnou lakázou z T. versicolor.
Grantová podpora: Grant Ministerstva školstva Českej republiky (Projekt č. NPVII-2B06151); Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. (ústavný vedecký zámer AV0Z50200510).

[1] I. Eichlerová, L. Homolka, L. Lisá, F. Nerud (2006) J. Basic Microbiol. 46: 449-455.
[2] T. Fukuda, H. Uchida, M. Suzuki, H. Miyamoto, H. Morinaga, H. Nawata, T. Uwajima (2004) J. Chem. Tech. Biotech. 79: 1212-1218.
[3] Z. Ronen, A. Abeliovich (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66, 2372-2377.
[4] S. Riva (2006) TRENDS in Biotechnology 24, 219-226.

P34
Biodegradace bromovaných aromatických látek

Petříčková A., Uhnáková B., Vejvoda V., Rázga M., Homolka L., Martínková L.
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i. Centrum Biotransformaccií a Biokatalýzy, Vídeňská 1083, Praha 4, 14220
a.petrickova@seznam.cz

Tetrabromobisfenol A (TBBPA) a 2,4,6-tribromofenol (TBP), používané jako zpomalovače hoření, jsou špatně rozpustné, perzistentní látky, které se ukládají v půdě a sedimentech a obtížně podléhají biodegradaci. TBP vzniká spolu s mono- a dibromfenoly také při při spalování olovnatých benzínů. Tyto látky představují riziko pro životní prostředí a člověka. V této práci bylo prokázáno, že houby bílé hniloby dřeva (Trametes versicolor, Pleurotus ostreatus) jsou schopny bromované aromatické látky odbourávat. Ve filtrátu media z kultivace T. versicolor v přítomnosti bromovaných látek byly přítomny extracelulární oxidasy (laccasa, Mn-peroxidasa), které se pravděpodobně na odbourání těchto látek podílejí. K biodegradaci bromovaných aromátů byla použita také komerční laccasa z T. versicolor.
Financováno z grantu 2B06151 (MŠMT)

P35

Evaluation of cytotoxicity of new DNA-intercalators 2´, 2´´-[(acridine-3,6-diyl) diimino] -1,3-diimidazolidine-4-one derivatives

Vantová Z., Paulíková H., Hudecová D., Kožurková M., Sabolová D., Dovinova I., Kristián P., Imrich M., Ungvarský J., Janovec L.
Oddelenie biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU v Bratislave,Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta Univerzita P.J. Šafárika v Košiciach
zuzana.vantova@gmail.com

Acridines are known to interact with DNA, mainly by intercalation and some of them are used as chemotherapeutic agents in cancer therapy. Four derivatives of 2´,2´´-[(acridine-3,6-diyl) diimino]-1,3-diimidazolidine-4-one derivatives (DIM) with different alkyl chains (propyl-, butyl-, pentyl-, hexyl-) have been synthesized, and DNA binding properties of these new drugs with purified thymus DNA has been studied by UV-Vis and fluorescent spectroscopy and circular dichroism. From the titration data it was possible to assume that the intercalation is the dominant binding mode. The highest value of binding constant 1.2@105 M-1 was estimated for propyl-DIM. Cytostatic effects of all derivatives have been tested against human leukaemia HL-60 cells (MTT-assay and direct counting of viable cells, 72-hrs treatment). Uptake of DIM derivatives has been investigated and the fluorescence of accumulated substances has been estimated. Strong cytotoxicity of all derivatives has been confirmed, the highest cytostatic effect has been observed when cells were incubated with hexyl-DIM (IC50 = 0.12Ī0.05 uM, 48 h). Hexyl-DIM entered into HL-60 cells very fast and already after 30-min incubation the fluorescent complex of DIM with chromosome was noticeable. Changes of cellular morphology (dyeing of cells with propidium iodide and Hoechst 33343) and analysis of intranucleosomal fragmentation of DNA (DNA-ladder) indicated that 12 uM hexyl-DIM induced apoptosis already after 4-h treatment of HL-60 cells.

P36

The mechanism involved in the effects of pentoxifylline on the P-glycoprotein – mediated multidrug resistance in L1210/VCR cells

Boháčová V., Barančík M., Dočolomanský P., Breier A.
Institute of Molecular Physiology and Genetics SAS, Institute of Heart Research SAS, Bratislava, Slovakia
viera.bohacova@savba.sk

Multidrug resistance (MDR) of neoplastic cells represents a specific type of resistance when neoplastic cells become resistant to the diverse groups of chemotherapeutic agents with unrelated chemical structure and mechanisms of pharmacological action. Development of the MDR phenotype is often associated with overexpression and increased transport activity of P-glycoprotein (P-gp), the specific integral protein of plasma membrane. P-gp is the product of mdr gene and is a member of the large superfamily of membrane transports proteins (ATP- hydrolyzing efflux pump). Several drugs were found to depress the P-gp mediated MDR.
9.In the present study the ability of xantine derivatives (pentoxifylline – PTX, theophylline -THP) to depress of the MDR phenotype of L1210/VCR cells was tested. The drug sensitive L1210 and multidrug resistant L1210/VCR mouse leukemic cell lines were used as an experimental model. We found that from tested methylxantines only PTX was able to reverse the drug resistance in L1210/VCR cells. Other methylxantines like THP were not able to depress MDR. To determine more precise the mechanisms involved in MDR reversal action of PTX we investigated its effects on enzymes involved in modulation of apoptosis. We found that the presence of PTX induced changes in activation of anti-apoptotic Akt kinase in resistant cells. In resistant cells was also observed, in comparison to sensitive cells, significantly lower vincristine-induced activation of both caspase-3 and caspase-9. The presence of PTX did not influence the activation of caspase-3 but we observed its effects on modulation of caspase
Supported by VEGA SR No 2/7124/27, 2/6080/26, APVV 51-027404.

P37
Really interact derivatives of PTX with P-glycoprotein at the drugs binding site?

Dočolomanský P., Boháčová V., Barančík M.
Institute of Molecular Physiology & Genetics, SAS, Institute for Heart Research, SAS, Bratislava, Slovakia
peter.docolomansky@savba.sk

The resistance of tumor cells to cytotoxic drugs is a problem in cancer chemotherapy. The multidrug resistance (MDR) phenotype associated with the overexpression of membrane P-glycoprotein (P-gp), is defined as a cross-resistance to a wide range of structurally diverse anticancer agents. Several substances (chemosesitizers) can restore the sensitivity of resistant tumor cells against anticancer drugs. This effect was described earlier for pentoxifylline (PTX) and its derivatives [Breier et al.]. To characterize the structural features important for reversal effects of PTX we prepared a set of N1-, N3-, N7- and C8-substituted alkylxanthines derived from PTX and tested their effects on Vincristine resistance of MDR cell line L1210/VCR [Kupsakova et al.]. However, the structural patern of electron donor groups of PTX-derivatives is in accordance with the substrates of P-gp; the mechanism, how interact these PTX-derivatives with P-gp is not clearly known [Seelig et al.]. Therefore, we prepared columns with immobilized PTX for affinity chtomatography of cytosolic and particulate fractions of L1210 and L1210/VCR cells lines, respectively. We consequently analyzed eluted fractions by western blot to detect proteins. The results showed that the inhibition of P-gp mediated MDR is increased by: i) prolongation of alkyl chain at the both N3 and N1 positions, ii) presence of polar substituent on alkyl chain at the position N1. The results indicate that the effectivity of xanthines in reversal of MDR resistance is dependent on the longer polar substituent in position N1.

Breier et al. Neoplasma 41, 1994, 297-303
Kupsakova et al. Eur.J.Pharm.Sci. 21, 2004, 283-293
Seelig et al. Drug Bioavailability /Estimation of Solubility, Permeability and Absorption, 2003, 461-492,
Supported by grants: VEGA SR 2/7124

P38
Zapojenie receptorov pre retinoidy de regulácie expresie a transportnej aktivity P – glykoproteínu

Sulova Z., Macejova D., Seres M., Sedlak J., Brtko J., Breier A.
UMFG SAV, UEE SAV, UEO SAV, Bratislava, Slovakia
zdena.sulova@savba.sk

Viacliekové (multidrug) rezistencia (MDR), je veľmi často spojená s expresiou P-glykoproteínu (P-gp). Rozvoj MDR predstavuje závažný problém pri chemoterapii nádorov a preto sa regulacii expresie P-gp venuje velká pozornosť. Napriek tomu je proces expresie P-gp v neoplastických bunkách objasnený len čiastočne (1). Jadrové receptory pre kyselinu retinovú sú zahrnuté v kontrole expresie velkého množstva proteínov (2). V predloženej práci sme sledovali, či sa receptory pre retinoidy nejakým spôsobom nepodieľajú pri regulácii expresie P-gp. V bunkách L1210/VCR cells, ktoré exprimujú vysokú hladinu P-gp, sme zistili zvýšené hladiny mRNA kódujúcej RAR alfa a gama a zníženú hladinu mRNA pre RAR beta, RXR beta a gama v porovnaní s P-gp negatívnymi L1210 bunkami. Hladiny mRNA pre RXR alfa neboli merateľné. All-trans-retinová kyselina (ATRA), ligand pre receptory kyseliny retinovej (RAR), nemá vplyv na viabilitu ani P-gp pozitívnej ani P-gp negatívnej bunkovej línie. Samotná ATRA neovplyvňuje expresiu ani transportnú aktivitu P-gp v bunkách L1210/VCR. Ak sa pridáva k bunkám v kombinácii s verapamilom (inhibítor P-gp) dochádza k signifikantnému zníženiu expresie aj transportnej activity P-gp, napriek tomu, že ATRA nie je substrátom P-gp. Uvedené fakty naznačujú, že kyselina retinová, cez receptry pre kyselinu retinovú, môže čiastočne kontrovať expresiu P-gp v bunkách L1210/VCR.

1. Breier A. et al. Curr. Canc. Drug Tar. 5, 457-468 2005
2. Brtko J.and Thalhamer J., Curr Pharm Des. 9, 2067-77, 2003

Acknowledgements. Acknowledgement: This work was supported from grant APVV-0084-07 and Slovak Grant Agency for Science VEGA grants No. 2/7122, 2/6080

P39

Influence of ischemia/reperfusion and modulation of PI3K/AKT kinase pathway on matrix metalloproteinases activities in rat hearts

Špániková A., Ivanová M., Matejíková J., Ravingerová T., Barančík M.
Inst Mol Physiol Gen, Cent Excell Cardiovasc Res SAS; Inst Heart Res, Cent Excell Cardiovasc Res SAS, Bratislava, Slovakia
anna.spanikova@savba.sk

Matrix metalloproteinases (MMP) are enzymes that play an important role in degradation and remodeling of extracellular matrix under physiological and pathological conditions. MMP-2 has been also shown as a primary mediator of the acute mechanical dysfunction of the heart immediately after ischemia and reperfusion. It was demonstrated that the expression and activation of MMPs is regulated through kinase signaling pathways such as PI3K/Akt. LY294,002 (LY) and wortmannin (WT) are specific inhibitors of PI3K/Akt kinase pathway which is a key signaling system implicated in cell survival and metabolic control in various cell types. The aims of the study were to investigate the influence of cycles of ischemia/reperfusion on MMP and to study the effects of LY and WT on modulation of these MMP activites. LY or WT were infused before and during the ischemia/reperfusia (I/R) and the tissue samples were collected at before and during I/R. The levels and activation of proteins were determined by immunoblot assay. The activities of MMP were measured by zymography. We found that ischemia induced time-dependent activation of MMP-2. Strong activation occurred after 15 min ischemia, during prolonged ischemia and following reperfusion the MMP-2 activities declined. Two cycles of short ischemia and reperfusion (IP) that led to increased cardiac tolerance against prolonged I/R reduced MMP-2 activities and induced also an activation of Akt kinase (Akt). The application of both LY and WT was connected with inhibition of IP-mediated Akt activation. Moreover, the actions of both LY and WT were linked with modulation of MMP-2 activities. Our results suggest that MMP-2 is involved in the responses of rat hearts to ischemia and modulation of its activities plays also role in cardioprotective mechanisms of IP. The results also point to possible relationship between Akt kinase and modulation of MMP-2 activities in rat hearts.
Supported by VEGA SR No 2/6170/27, 2/7169/29, APVV 51-027404

P40

The effects of protein kinases inhibitors on P – glycoprotein – mediated multidrug resistance in L1210/VCR cells

Barančík M., Boháčová V., Sulová Z., Sedlák J., Breier A.
Inst Heart Res, SAS, Inst Mol Physiol Gen, SAS, Cancer Res Inst, SAS, Bratislava, Slovakia
Miroslav.Barancik@savba.sk

The transmembrane transport pump P-glycoprotein (P-gp) causes the efflux of chemotherapeutic agents from cells and is an important system that secures multidrug resistance (MDR) of neoplastic cells. In the present study drug sensitive L1210 and multidrug resistant L1210/VCR mouse leukemic cell lines were used as an experimental model. We found that both LY294,002 (inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway) and U0126 (inhibitor of ERK pathway), significantly and in concentration-dependent manner reduced the degree of vincristine (VCR) resistance in L1210/VCR cells. This was in both cases accompanied by decrease in IC50 value to vincristine. Monitoring of P-gp function using calcein/AM assay showed that LY294,002 in concentration dependent manner depressed the P-gp transport activity in L1210/VCR. FACS analysis of proportion of cells in apoptosis or necrosis by annexin-V apoptosis kit showed that VCR induced apoptosis in resistant cell to much lower extent as in sensitive cells. LY294,002 alone did not induce apoptosis but its application together with VCR significantly increased the number of apoptotic cells. The reversal of VCR resistance of L1210/VCR cells by LY294,002 was also associated with marked activation of caspase-3. This activation of caspase-3 was not observable by the MDR reversal effects of U0126. On the other hand, the application of U0126 together with VCR induced, in contrast to LY294,002, reduction of protein levels of heat stress protein 90 (Hsp90). The above findings suggest the possible involvement of ERK and PI3K/Akt kinase pathways in modulation of P-gp mediated multidrug resistance in L1210/VCR mouse leukemic cell line. The data also point to the differences in mechanisms involved in the MDR reversal effect of LY294,002 and U0126.
Supported by VEGA SR 2/7122/27, 2/6080/27, APVV 51-027404.

P41
Vplyv overexpresie P – glykoproteínu na indukciu apoptózy s cisplatinou v L1210 bunkách

Gibalová L., Sedlák J., Hulíková B., Breier A., Barančík M., Sulová Z.
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Ústav virológie, Ústav experimentálnej onkológie, Ústav výskumu srdca
lenka.gibalova@savba.sk

Viaclieková (multidrug) rezistencia (MDR) je najčastejšou prekážkou účinnej chemoterapie nádorových ochorení. Rezistentné bunky vykazujú rezistenciu voči širokému spektru štrukturne i funkčne nepríbuzných látok. Niektoré MDR línie sú rezistentné aj na apoptózu indukovanú chemoterapeutikami (1). Induktor apoptózy, cisplatina (cisPt), je známa ako antineoplastikum, ktoré nie je substrátom pre Pgp, preto sme ju použili na indukciu apoptózy leukemickej línie L1210 (senzitívne (S)) a L1210/VCR (rezistentná (R)), kde je MDR sprodtredkovaná práve P-glykoproteínom (Pgp). CisPt je toxická pre obidve bunkové línie, ale R bunky vstupujú do apoptózy v menšej miere než S bunky po krátkodobej i dlhodobej kultivácii buniek s cisPt. Súčasne sme zistili aj rozdiely v hladinách proteínov regulujúcich apoptózu, Bax a Bcl-2, v cytosolovej a membránovej frakcii z obidvoch typov buniek a aj rozdielne pomery obidvoch proteínov v komplexe Bcl-2/Bax, čo naznačuje zmenenú apoptickú odpoveď v bunkách exprimujúcich Pgp.

1. Lamming DW Jr: J. Undergrad. Sci. 3: 127-134, 1996.
2. Basu and Haldar: Mol. Hum. Repr. 4: 1099-1109, 1998.

Táto práca bola podporovaná: APVT-51-027404,VEGA-2/7122/7 a VEGA 2/080/26.

P42
Analysis of the impact of cadmium on the level of hepatic metallothioneins and selected enzymes in experimental rat model

Zidek V., Zidkova J., Kontrova K., Sajdok J., Szabova K., Fucikova A., Szakova J., Tlustos P., Sestakova I., Pravenec M.
Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague;
jarmila.zidkova@vscht.cz

Influence of contamination of the environment with heavy metals is widely studied. Analysis of the impact of heavy metals, especially Cd and Pb individually and in combination in the form of inorganic salts corresponding to daily intake in experimental diets on oxidative stress in experimental animals was studied. Metallothioneins (MT) are considered to be important in homeostatic control and their role is examined in connection with oxidative stress. Relationship between the level of hepatic MT and the exposure of the rat to heavy metals has been shown .
Quantity of the rat MT was performed by differential pulse polarography. Determination of the specific activity of oxidative stress enzymes was performed in heparinized plasma. Peroxidase, superoxiddismutase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase and catalase were selected for our studies. In the case of glutathionreductase, the increase of enzymatic activity is considerable after intraperitoneal application of cadmium solution in comparison with cadmium application in diet or tap water. The influence of the genetic background of the animals has been studied on the transgenic recombinant strains of rat.
Funding: MSM 6046137305 and GACR 523/06/0439

P43

Využití toxikogenomiky při studiu mechanismů působení cizorodých látek v životním prostředí na lidské zdraví

Líbalová H., Merkerová M., Kráčmarová A., Topinka J., Rössner P., Milcová A., Brdička R., Stránecký V., Ivánek R., Balaščák I., Šrám R. J.
Ústav experimentální medicíny, AV ČR, v.v.i., Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; 1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha; Ústav molekulární genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha; 2.lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha
libalova@biomed.cas.cz

Projekt ENVIRONGEN se zabývá využitím toxikogenomiky k objasnění mechanismů negativních účinků expozice člověka cizorodým látkám v životním prostředí (zejména ovzduší). Jako modelová populace byly zvoleny matky a jejich potomci narozeni ve fakultní nemocnici Motol v Praze, u kterých bude studována odpověď organismu na expozici toxickým látkám z hlediska celkové genové exprese a dalších biomarkerů a přenos toxických látek a jejich účinků z matky na plod. V rámci pilotní studie byly odebrány biologické vzorky (žilní krev matky, pupečníková krev a definovaná část placenty) od 79 matek. Změny v genové expresi byly sledovány na úrovni celého genomu za využití mikročipů Human Ref-8 firmy Illumina. Na základě výsledků analýzy genové exprese budou vybrány toxikologicky významné geny, exprese těchto genů bude ověřena metodou RT PCR. K určení biologicky efektivní dávky genotoxických látek byla stanovena hladina DNA aduktů v lymfocytech žilní a pupečníkové krve a placenty metodou 32P – postlabelling, také byla měřena hladina kotininu (metabolit nikotinu) v krvi matek jako marker expozice tabákovému kouři. Zároveň bylo na stanici ČHMÚ (AIM Praha 5) prováděno stacionární měření koncentrace prachových částic (PM2.5) a polycyklických aromatických uhlovodíků. Jako markery oxidačního poškození biologických makromolekul byla prováděna stanovení 8-oxodeoxyguanosinu (nejčastější produkt oxidace bází v DNA), stanovení oxidace karbonylových skupin proteinů a peroxidace lipidů. Cílem studie je kompletní celogenomová analýza a následná identifikace genů, jejichž exprese je vlivem expozice cizorodým látkám a dalších faktorů deregulována. Detekce expresních profilů bude korelována s biomarkery expozice (DNA adukty v lymfocytech, oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů), účinku (chromosomové aberace) a vnímavosti (polymorfismus metabolických a reparačních genů) a s dotazníkovými údaji o zdravotním stavu a životním stylu matky.
Tato studie je podpořena grantem MŠMT ČR č. 2B06088.

P43A

Novel metyl-2-[2-(acridine-9-ylimino)-4-oxo-1,3-tiazolan-5-yliden] derivatives as DNA intercalators and glutathione modulators with antitumour activity)

Paulíková H., Vantová Z., Keltošová S., Kožurková M., Sabolová D., Kristián P., Imrich M., Janovec L.
Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, STU, Radlinského 9, Bratislava, Slovakia; Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, Moyzesova 11, Košice, Slovakia.

There are evidence suggests that therapy of cancer with multitargets cytostatic provide an improved treatment. The DNA is main target for large family of chemotherapeutic agents used in cancer therapy. We have designed and synthesized metyl-2-[2-(acridine-9-ylimino)-4-oxo-1,3-tiazolan-5-yliden] with substituents on the thiazole, such as p-Br-fenyl-, sec-butyl- and terc-butyl- (p-Br-fenyl-AT, sec-butyl-AT and terc-butyl-AT). Their DNA-binding activities, SH-reactivity and antitumour activity against human leukemia cells HL-60 have been evaluated. Cytotoxicity of these substances against HL-60 has been confirmed, IC_{50} values were from 0.9 μM to 3.0 μM (72-h treatment). The most potent cytotoxic derivative was p-Br-phenyl-AT. Morphological changes of HL-60 cells have been observed and some signs of apoptotic cell death have been noticed. AT-derivates induced shrinking of cells, blebbing of plasmatic membrane and condensation of chromatin. Influx of AT derivates into HL-60 cells was very fast, the presence of substances in cells was determined by fluorescent microscopy already after 1 hour incubation. AT-derivates have been found in nucleus and in some membrane structures. Apoptosis has been confirmed by detection of intranucleosomal fragmentation induced by AT-derivates. The DNA-binding activity of AT-derivatives has been estimated, binding constants were from 0.35±0.05 to 5.89 ±0.81x10^6 [M^{-1}]. Cytotoxicity of AT-derivatives corelated with their DNA-binding activity. All substances irreversibly reacted with thiols and they change the level of intracellular glutathione. We suppose that high cytotoxicity of AT-derivates is associated with DNA-damage and with modification of SH-groups.
Acknowledgement
This work has been supported by VEGA grant 1/0053/08 and 1/0462/08.

Přednášky

O15
Polární transport rostlinného hormonu auxinu na buněčné úrovni: Jak dovnitř a jak ven?

Zažímalová E.
Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, Praha 6
eva.zazim@ueb.cas.cz

Auxin hraje zásadní úlohu v regulaci prostorových a časových aspektů růstu rostlin a přispívá tak ke koordinaci a integraci jejich vývoje. Molekuly auxinů jsou v některých pletivech transportovány na delší vzdálenost a jejich transport je striktně polární. Mechanismus polárního transportu auxinu vychází z fyzikálně-chemických vlastností auxinových molekul a jejich molekulárních forem uvnitř a vně buněk. Jde o velmi komplexní a dynamický proces, regulovaný na více úrovních. Klíčovou složkou tohoto procesu jsou přenašeče auxinu z buněk, jejichž aktivita a subcelulární lokalizace určuje kvantitativní aspekty i směr polárního toku auxinu rostlinou. Aktivita těchto přenašečů je regulována na mnoha úrovních – od regulace genové exprese, přes cílené asymetrické umísťování na plasmatické membráně, až po biochemickou regulaci jejich funkce a jejich degradaci. Klíčovou roli v přenosu auxinů z buňky hrají proteiny z rodiny PIN, jejichž aktivita je přímo svázána s mnoha fyziologickými procesy v rostlině. Tyto sekundární transportéry vytvářejí velmi pružný systém, který je založen na různé expresi různých členů rodiny PIN, specifické pro určité pletivo nebo buněčný typ. Tento systém přenašečů auxinů typu PIN je schopen okamžitě reagovat na různé podněty v průběhu vývoje rostliny a pružně měnit distribuci auxinu mezi buňkami, pletivy nebo orgány. Auxin v určité koncentraci na určitém místě pak předává svůj signál následným signálním drahám, které vedou ke změnám ve vývojovém programu daných buněk.

Tato práce je podporována grantem MŠMT pro Centrum základního výzkumu č. LC 06034.

O16
Metabolické přeměny cytokininů u rostlin a kvasinek; Metabolic conversions

Frébort I., Galuszka P., Pospíšilová H., Frébortová J., Novák O.
Katedra biochemie, PřF, Univerzita Palackého v Olomouci; Laboratoř růstových regulátorů, ÚEB AVČR
ivo.frebort@upol.cz

Cytokinins are plant hormones contributing to regulation of a variety of developmental processes including apical dominance, flower and fruit development, leaf senescence, and seed germination. They bind to cell surface receptors and initiate a specific signal transduction cascade. Structural features including the nature of the side chain attached to the adenine moiety, conjugation with sugars and phosphorylation affect the biological activity of cytokinins. Cytokinins are inactivated by oxidative cleavage of the side chain by cytokinin dehydrogenase (CKX, EC 1.5.99.12), a flavoprotein containing covalently bound cofactor FAD that is recycled during the catalytic reaction via quinones derived from oxidation of plant phenolics. Genome-wide studies revealed that in higher plants, CKX proteins are encoded by small gene families. Study of the seven members of the Arabidopsis thaliana CKX family shows that secreted enzymes AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5 and AtCKX6 regulate the level of cytokinins in apoplast, cleaving preferably free cytokinin bases. AtCKX1 that may recycle components of cytokinin molecules in vacuoles shows specificity to cytokinin ribosides and cytokinin N9-glucosides and AtCKX7 may perform this function in cytoplasm. Physiological meaning of such a preference is so far unclear, because cytokinin N9-glucosides were found inactive in many biotests. Another vacuolar enzyme, AtCKX3, degrades preferentially cytokinin nucleotides. Substrate specificity of CKX enzymes seems to be predetermined by the nature of a single amino acid residue positioned near the entrance to the substrate channel that interacts with N9 atom of the cytokinin. Neither AtCKX enzyme exhibits specificity towards aromatic cytokinins that are very weak substrates. Further investigation on cytokinin degradation showed that yeast adenine deaminases (EC 3.5.4.2) hydrolyzes cytokinins, but this activity has not been detected with a homologous enzyme from Arabidopsis.

O17

Rekombinantní apoptotické rostlinné nukleázy a analýza jejich protinádorových a biologických aktivit

Matoušek J., Podzimek T., Poučková P., Lipovová P. J., Orctová L., Stehlík J.
Biologické centrum AV ČR v.v.i. ÚMBR, Č. Budějovice; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. , Liběchov.
jmat@umbr.cas.cz

V práci byly klonovány rostlinné nukleázy celkem ze tří zdrojů: z řapíků viroidem infikovaných rajčat (TBN1) z pylu viroidem infikovaného chmelu (HBN1) a z listů druhu A. brassica (ABN1). Byla rozpracována technologie přípravy uvedených enzymů, která zahrnuje klonování cDNA do rostlinných vektorů, přípravu kmenů A. tumefaciens. Agrobakteriální listovou infiltraci druhu N. benthamiana a biochemickou purifikaci uvedených enzymů. Bylo prověřeno, že za daných podmínek lze ze 100 g infiltrovaných listů získat 10 mg čisté nukleázy, která rozštěpí do mononukleotidů 1.2 g vysoce polymerní ss nebo ds DNA za 1 min při 37 ˚C. Dle analogie s protinádorovou aktivitou živočišných RNáz a na základě našich předešlých studií rostlinných nukleáz (Souček e.a. Neoplasma 53:402, 2006 a Lipovová, P. e.a. Neoplasma 55:157, 2008), byly rekombinantní nukleázy testovány na protinádorovou aktivitu a vedlejší účinky jako embryotoxicita, imunosuprese a aspermatogeneze. Bylo zjištěno, že zejména nukleázy TBN1 a HBN1 projevují ve srovnání s živočišnými RNázami jako BS RNáza mnohem nižší cytotoxické účinky. Přitom například nukleáza TBN1 je po PEGilaci velice selektivní a účinná na lidský neuroblastom nebo melanom kultivovaný na myších i při aplikaci intravenózně. Tato skutečnost by mohla otevírat perspektivu zařazení rostlinných nukleáz jako protirakovinových agens do klinických zkoušek, podobně jak je tomu u cytotoxické onkonázy. Současná práce se orientuje na studium modifikací nukleáz pro oblehčení jejich purifikace fůzí C-konce s dvojitou stabilní histidinovou kotvou. Pro další perspektivu zvýšení antitumorogenní aktivity, nádorové selektivity a snížení toxicity se předpokládají sekvenční modifikace uvedených nukleáz s využitím metod site-specifické mutageneze, cDNA schuffling a postranslačních modifikací in vivo prostřednictvím systému “leaf factory”. „In progress“ je studium působení rekombinantních nukleáz na nádorové buňky.
Práce je financována z GAČR 521/06/1149 a AV0Z50510513.

O18

Struktura a funkce aminoaldehyd-dehydrogenasy u semenáčků hrachu Structure and function of pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase

Tylichová M., Briozzo P., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic; UMR 206 de Chimie Biologique, AgroParisTech-INRA, F-78850 Thiverval-Grignon, France
marek.sebela@upol.cz

Aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH, EC 1.2.1.19) oxidizes omega-aminoaldehydes arising from polyamine degradation. Pea seedling AMADH exists in two isoforms (AMADH1 and AMADH2). Based on their amino acid sequences, the enzymes are related to betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs, EC 1.2.1.8), which participate in plant response to osmotic stress. In this work, pea AMADH1 and AMADH2 cDNAs were expressed in E. coli and the recombinant proteins were purified to homogeneity. AMADH1 was cocrystallized with NAD+ and then X-ray data were collected up to 2.8 Ansgtroem resolution. Molecular replacement using a human aldehyde dehydrogenase confirmed that recombinant AMADH1 is a dimer. The asymmetric unit contains 12 monomers, each of 518 residues. The crystal structure is currently under refinement. Enzyme kinetics was performed with both recombinant enzymes. The obtained results show that AMADH2 has much better affinity to the best natural substrate 3-aminopropionaldehyde compared with AMADH1 and that the compound is also oxidized more efficiently. Both enzymes are able to oxidize various natural and synthetic omega-aminoaldehydes and their derivatives. They also slowly oxidize some elementary aldehydes (C2-C7) and pyridine carboxaldehydes. To get insight into AMADH catalysis and specificity, site-directed mutagenesis and crystallization of AMADH2 have been proposed. Expression and purification of AMADH2 active-site mutants are in progress.
Supported by the grant 522/08/0555 from the Czech Science Foundation.

O19

Structural analysis of PsbP protein of the oxygen-evolving complex from *Spinacia oleracea*

Ristvejová J., Lapkouski M., Sovová Ž., González-Pérez S., Kopecký Jr. V., Revuelta J. L., Arellano J. B., Ettrich R.
Laboratory of High Performance Computing, Institute of Systems Biology and Ecology of AS CR, Institute of Physical Biology of USB, Zámek 136, 37333 Nové Hrady, Czech Republic; Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, 12116 Prague 2, Czech Republic; Departamento de Estrés Abiótico, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), Apdo. 257, 37071 Salamanca, Spain; Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Microbiología Bioquímica, Universidad de Salamanca/CSIC, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain
ristvejova@greentech.cz

In oxygenic photosynthesis sunlight is converted into chemical energy. Water splitting, which gives rise to molecular oxygen, is performed in a cluster of four Mn2+ ions located on the lumenal side of photosystem II (PSII) and Ca2+ and Cl- ions are required for optimal activity of this water–oxidase complex. In higher plants the function of Ca2+ and Cl- is modulated by the presence of four extrinsic proteins, PsbP, PsbQ, PsbO, and PsbR, at the lumenal surface, the so called oxygen-evolving complex. To understand the molecular mechanisms of the oxygen–evolving reaction, an essential prerequisite is the structural knowledge of these proteins and their relative interactions. The structure of recombinant protein PsbP of the oxygen-evolving complex from Spinacia oleracea was determined at a 1.98 A° resolution by X-ray crystallography and the unresolved parts further refined by Raman and FTIR spectroscopy. For protein preparation the overexpression system Escherichia coli (BL21DE3) transformed by plasmid DNA with gene PsbP (recombinant HisPsbP) was used to produce stable protein in bisTRIS buffer (pH=6,00) in a concentration of 15 mg/ml. Computational modeling and molecular dynamics in combination with biochemical and biophysical methods like site-directed mutagenesis, crosslinking, gel filtration, native electrophoresis and calorimetry were applied to study and describe the interactions of PsbP and PsbQ. Our results represent an important step towards the full molecular description of the oxygen-evolving complex of PSII in higher plants.

MSMT No: LC 06010

Postery

P44
Transgenic barley (Hordeum vulgare L.) with enhanced expression of cytokinin dehydrogenase gene

Vyroubalová Š., Galuszka P., Ohnoutková L.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc, Czech Republic, Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Experimental Botany, Sokolovská 6, 77200, Olomouc, Czech Republic
sarka.vyroubalova@upol.cz

Barley is one of the most important crops in the world@s agriculture. Hence, it is today inevitable to improve or create new qualities of barley traits by genetic manipulation.
Cytokinin dehydrogenase is an enzyme responsible for the irreversible degradation of plant growth regulators – cytokinins. The main functions of cytokinins and their accurate equilibrium in plants are promotion of cell division and correct organ differentiation, followed by control of lateral buds growth, expansion of leaves and delay of senescence. Genomic form of gene gHvCKX2 (NCBI# AF490591) encoding functional cytokinin dehydrogenase (CKX) from barley was used for construction of different transformation vectors.
Transgenic tobacco carrying gene gHvCKX2 under 35S promoter showed distinctive cytokinin deficient phenotype with dwarf over-ground part and enormously enhanced root system. Unfortunately, regeneration frequency of barley calli was very weak. Overexpression of gene gHvCKX2 during selection phases of transformants probably influenced ability of proper regeneration. Transgenic barley overexpressing gene gHvCKX2 produced fewer clums compared to control plant. Delay onset of flowering was also observed.
Concurrently, tissue and organ specific barley promoters were cloned and functionally tested in Arabidopsis thaliana with using gus reporter gene.

P45
Localisation of Pcb antennae complexes in Prochlorothrix hollandica under various growing conditions

Herbstová M., Prášil O.,Vácha F.
Ústav molekulární biologie rostlin, Biologické centrum Akademie věd České Republiky v Českých Budějovicích;
Ústav fyzikální bilogie, Jihočeská Univerzita v Českých Bdějovicích;
Mikrobiologický ústav, Akademie věd České Republiky v Třeboni
herbstova@centrum.cz

A filamentous freshwater phytoplankton P. hollandica belongs to an unusual group of cyanobacteria generally called „prochlorophyta“ that do not use phycobilisomes as the light harvesting complexes. Instead, they can, similarly to high plants, synthesize chlorophyll (chl) a and b that bind it into Pcb light harvesting proteins coded by pcbA, pcbB and pcbC genes. They are similar to the IsiA, chl a-binding proteins induced in response to iron deficiency in many cyanobacteria and to the CP43 protein forming the photosystem II inner antenna. The aim of this work was to identify and localise Pcb antennae proteins in P. hollandica grown under low-light (LL) and high-light (HL) conditions.
Thylakoid membranes were isolated and solubilized by 1% n-dodecyl ß-D-maltoside and loaded onto a sucrose density gradient. Six fractions were obtained in LL samples and three fractions in HL samples. The separate zones were characterised by the absorption and fluorescence emission spectroscopy. The protein composition was determined by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the Pcb proteins were detected by immunoblot analysis.
Intact chlorophyll pigment-protein complexes of photosystem I (PS I) and II (PS II) in various oligomeric states were separated by Blue-native or green-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN or GN-PAGE). Subunit protein composition of complexes was resolved by the second dimension SDS-PAGE and than Pcb proteins were identified by Western blotting.
Protein expression in both cultures (HL and LL) was compared by labelling proteins with fluorescent dyes before 2D separation.

P46
The role of nitric oxide during regeneration of cucumber cells from protoplast suspension

Luhová L., Vaníčková P., Piterková J., Navrátilová B., Petřivalský M.
Department of Biochemistry and Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic
lenka.luhova@upol.cz

Plant protoplasts present unique single cell system as an efficient experimental model for physiological and molecular studies and also valuable tool for biotechnological applications like somatic hybridization and genetic transformation. Protoplasts isolated from plant tissue may divide and form calli, which successively undergo morphogenesis leading to whole plant development. Cell-wall reconstitution and control of oxidative stress belongs among the prerequisites for protoplast survival and division. Nitric oxide (NO) is plant signalling molecule which together with hydrogen peroxide participates in the initiation of programmed cell death. Hydrogen peroxide participates in the cell-wall strengthening, in the induction of defence-related genes and in the initiation of plant cell death. The involvement of both molecules in regeneration processes of cucumber mesophyll protoplasts cultivated in liquid medium were studied by using NO donors (nitroprusside, nitrosoglutathione), NO scavenger (cPTIO), inhibitor of NO synthase (L-NAME), antioxidants (rutin, ascorbate, catalase) and inhibitor of NADPH oxidase (imidazole). Antioxidant effect of NO was confirmed after the application of NO donor, while high potential of microcalli formation was detected in the medium with reduced level of NO. The effect of NO on regeneration processes after protoplast isolation and on the intensity of cell division is evident from our results.

This work was supported by the grant MSM 6198959215 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

P47
Electron microscopy in structural characterization of Photosystem I and Photosystem II complexes from chromophytic alga Xanthonema debile

Gardian Z., Vácha F.
Biological Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic; Institute of Physical Biology, University of South Bohemia; Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia
gardian@greentech.cz

The Chromophytes (Heterokont or chlorophyll c-containing algae) play a major role in the photosynthetic carbon fixation in the oceans. Their photosynthetic apparatus differs in pigment composition from that of green plants and algae. The chromophytic alga Xanthonema debile was batch cultivated and bubbled with air at room temperature. The digitonin solubilized thylakoid membranes were loaded onto a DEAE Sepharose CL-6B anion-exchange column. Photosynthetic complexes were eluted from the column with concentration of 120 mM NaCl and loaded onto sucrose gradient. After centrifugation the sample was separate into a band with LH antennae and a band with PSI and PSII core complexes.
Freshly prepared photosynthetic complexes were used for electron microscopy. The specimen was placed on glow discharge carbon-coated copper grids and negatively stained. Micrographs were digitized and analysed with 'Spider and web' software.
The overall structure of Photosystem II was found to be similar to that known from green alga and cyanobacteria. Photosystem I was determined as a monomeric unit consisting of PsaA/B core complex. We have observed only one type of light-harvesting complexes. The structure of this LH antennae is discussed.
Although the Chromophytes are phylogenetically distinct from the green lineage and also from the red algae and cyanobacteria, their PSI and PSII complexes are the "green lineage" type structures.

P48

Apoplastic and non-secreted cytokinin dehydrogenase from maize: homology and diversity

Šmehilová M., Galuszka P., Kowalska M., Bilyeu K. D., Frébort I.
Palacký University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Division of Molecular Biology, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc; University of Missouri, Plant Genetics Research Unit, USDA, 110 Waters Hall, Columbia, USA
maria.smehilova@upol.cz

Plant hormones cytokinins are degraded by a cytokinin dehydrogenase (CKX, EC 1.5.99.12). There are several isoforms of CKX in each plant encoded by a small highly homologous gene family. These isoforms are differentially targeted in plant cells to achieve specific regulatory functions. Differences in local environments affect CKX activity and dictate differences in modes of biochemical action on cytokinin substrates and electron acceptors. Most of the CKX isoforms are localized in apoplast or vacuole; there is generally only one CKX isoform per plant per species that lacks a translocation signal and presumably functions in cytosol.
The best characterized CKX from maize is ZmCKX1, known to be secreted into the apoplast, while a gene encoding the non-secreted CKX has not been cloned before.
The aims of this work were to clone the gene for non-secreted CKX from maize (nsZmCKX), compare its localization with the apoplastic ZmCKX1 and characterize its biochemical and structural properties.
The gene for nsZmCKX was cloned successfully using the sequence information obtained from a survey of maize genome database. For determination of subcellular localization, the genes were fused with fluorescent markers and overexpressed in tomato hairy roots. Using confocal microscopy, ZmCKX1 signal was found in apoplast whereas nsZmCKX was detected in cytosol as predicted. The expression of the genes in transgenic tissues was confirmed by RT-PCR and by measuring the enzymatic activity. For further biochemical characterization, the recombinant nsZmCKX protein was prepared using Pichia pastoris expression system.

Supported by GACR 522/06/0703,522/08/H003 and MSM ME861

P49

RuBisCO jako bílkovina s afinitou k rostlinným brassinosteroidům, látkám s hormonální aktivitou

Kamlar M., Uhlík O., Šanda M., Kohout L., Macek T.
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.; Ústav biochemie a mikrobiologie FPBT VŠCHT
kamlar@uochb.cas.cz

Brassinosteroidy (BRs) jsou endogenní rostlinné polyhydroxysteroidy pozitivně regulující růst a vývoj rostlin. Mechanismus jejich účinku není dosud dostatečně objasněn, předpokládá se však, že působí prostřednictvím membránových receptorů, a to buď přímo, nebo prostřednictvím svého aduktu s vazebnou bílkovinou.
V této práci bude prezentována možnost izolace bílkovin s afinitou k rostlinným brassinosteroidům pomocí afinitní chromatografie na nosičích s nízkomolekulárními ligandy navázanými prostřednictvím orientované imobilizace, a následná identifikace takto získaných bílkovin. Jako pokusný materiál byl použit jednak špenát novozélandský (Tetragonia tetragonioides) a jednak len setý (Linum usitassimum). V obou případech bylo izolováno několik bílkovin, z nichž se podařilo zatím identifikovat pouze jedinou, a sice ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasu (RuBisCO).
O tomto enzymu – jakožto klíčové komponentě fotosyntetického aparátu rostlin – bylo napsáno již mnoho, vztahem RuBisCO a rostlinných BRs se ovšem doposud nikdo nezabýval. Jakou přesnou roli hraje RuBisCO v souvislosti s účinkem BRs (příp. jiných rostlinných steroidů) nebo naopak, je předmětem dalších studií.

Poděkování: Tato práce byla podporována z prostředků projektu „Centrum funkční genomiky a proteomiky ve šlechtění rostlin“, MŠMT 1M06030, a výzkumných záměrů Z40550506 a MSM604613730.

P50
Cloning and Expression of Plant Ornithine Delta-Aminotransferase

Stránská J., Snégaroff J., Tylichová M., Kopečný D., Šebela M.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic; Institut National Agronomique Paris-Grignon, Thiverval-Grignon, France
jana.stranska@volny.cz

Ornithine đ-aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13) is a PLP-dependent enzyme catalyzing the transamination of L-ornithine with 2-oxoglutarate. In plants, OAT has been found for example in pea and wheat. The physiological role of OAT is related to proline and arginine biosynthesis. Proline is known to have an important role in the adaptation of plant cells to drought and salinity stress.
In this work, a cDNA coding for pea OAT was obtained by reverse transcription of pea seedling mRNA followed by PCR amplification. A PCR product of about 1,500 bp, whose identity was verified by DNA sequencing (GenBank acccesion number EU414030), was cloned and expressed in E. coli to obtain C-terminally 6xHis-tagged recombinant protein. To achieve expression, the cDNA was digested by NcoI and XhoI, ligated into the pET28b+ plasmid vector and then used for transformation of NEB Express Competent E. coli cells. The cells were cultured in a liquid medium, harvested by centrifugation and disrupted for isolating the soluble cytoplasmic fraction. Recombinant OAT was partially purified by chromatography on HIS-select affinity gel under native conditions.
Basic molecular and kinetic properties of the recombinant enzyme were characterized. SDS-PAGE demonstrated a molecular mass value of 50 kDa, which is in agreement with data for other plant OATs. Activity assay was performed using a spectrophotometric method, which is based on the formation of a colored compound by the reaction of pyrroline-5-cyrboxylate with ninhydrin. A specific activity value of 0.3 nkat.mg-1 was measured in the lyzate, which increased to 5.6 nkat.mg-1 after the affinity purification.

Supported by the grants MSM 6198959216 and GACR 522/08/H003.

P51
Interakce cryptogeinu s vazebným místem na plasmatické membráně tabáku

Svozilová Z., Kašparovský T., Skládal P., Lochman J.
Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 61137 Brno, CZ
svozilova.z@seznam.cz

Existuje celá řada obranných mechanizmů, které rostlina využívá při obraně proti patogenům. Klíčovým bodem každé obranné reakce je včasné rozpoznání patogenu rostlinou. K tomu jsou nejčastěji využívány složky těchto patogenů (elicitory), které jsou rozpoznávány specifickými receptory. Tyto receptory primárně spouští obranné reakce. Není ovšem stále ještě dobře znám úplný molekulární mechanizmus, kterým rozpozná rostlina patogen ani mechanizmus přenosu signálu z receptoru pro elicitor. Elicitory elicitiny (např. cryptogein) jsou malé hydrofilní proteiny bohaté na cystein vylučované mnoha druhy Phytophthora, rozšířené a vysoce patogenní Oomycety, jako produkty avirulentních genů. Cryptogein je 10 kDa elicitor složený z 98 aminokyselin isolovaný z Phytophthora cryptogea, který je schopný vyvolat obrannou reakci u rostlin např. u tabáku. Vazebná místa pro cryptogein byla detekována na plasmatické membráně tabáku Nicotiana tabacum pomocí radioaktivně značeného 125I-cryptogeinu. Naše práce se zaměřila na studium přímé interakce cryptogeinu s receptorem pomocí piezoelektrického biosenzoru. Využívali jsme biosenzor založený na principu imobilizace jednoho ze členů afinitního páru na měřícím povrchu (cryptogein), který pak interaguje s volným vazebným partnerem v roztoku (plasmatické membrána). Sledováním změny tohoto signálu v reálném čase jsme získali informace o skutečném průběhu interakce mezi afinitními partnery.

P52

The comparison of the development of Oidium neolycopersici on the leaf and leaf discs of Lycopersicon spp. exposed to heat and cold shock pre-treatment

Piterková J., Matulková Z., Luhová L., Petřivalský M., Mieslerová B., Lebeda A.
Department of Biochemistry and Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 78379 Olomouc, Czech Republic
jana.piterkova@seznam.cz

Tomato powdery mildew (Oidium neolycopersici) is a biotrophic parasitic fungus. Intensive screening revealed many potential valuable sources of resistance mainly among wild Lycopersicon spp. (L. hirsutum, L. parviflorum and L. pennellii), whereas most of tomato cultivars (L. esculentum) are considered to be highly susceptible. Although passive preformed defence mechanisms to pathogens, such as waxy cuticle or antimicrobial compound reservoirs, can partly protect plants against the infection, the main and more frequent are the active responses to pathogenic infection including specific genes transcription and defensive products formation. The result of defence mechanisms action is decreased rate or complete suppression of pathogen development, eventually the prevention of its sporulation. Investigations confirmed that a widespread feature of disease resistance in pathosystem Lycopersicon spp. – O. neolycopersici is so called hypersensitive response (HR), which is characterized by a rapid localized death of cells in and around the initial infection site, and is interpreted as an attempt to prevent the spread of pathogens to non-infected parts of the plant. The pathogen development was investigated on the leaf and leaf discs of Lycopersicon spp. accessions differing in the level of resistance to powdery mildew infection. Plants and leaf discs were pre-treated by heat (42 °C) or cold shock (5 °C) for 2 hours and then were immediately inoculated by the powdery mildew. Peroxidase activity, production of hydrogen peroxide and nitric oxide, germination of conidia and fungal development were observed per each accession at 8, 24, 48 and 72 hours post inoculation. The cold shock treatment was shown to have significant influence on pathogenesis and caused retarded pathogen development on tomato plants.
This research was supported by grants MSM 6198959215 and 522/08/H003 from Czech Grant Agency.

P53

Elicitační účinek hydrolyzátů kolagenu a extraktů z dubové kůry a zázvoru na buněčné kultury tabáku a *Arabidopsis thaliana*

Klímová M., Šašek V., Burketová L., Martinec J.
Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, 160 02 Praha 6 – Lysolaje
klimovam@ueb.cas.cz

Cílem práce je identifikace a charakterizace nových látek biologické povahy využitelných v zemědělství k systémové ochraně rostlin. V první fázi projektu byly testovány elicitační vlastnosti extraktů z dubové kůry, zázvoru a hydrolyzátů kolagenu. Účinnek látek je kvantifikován pomocí jednoduchého testu, jehož principem je sledování změn pH media suspenzních buněčných kultur tabáku BY 2 a *Arabidopsis thaliana*. Elicitory vyvolávají po přidání do buněčné suspenzní kultury alkalizaci média. Příkladem popsaných elicitorů jsou ergosterol a kyselina salicylová. Tyto látky byly použity jako pozitivní kontrola.
Sušená dubová kůra a oddenky zázvoru byly extrahovány 16 hodin při laboratorní teplotě. Extrakty byly dále děleny pomocí jednoduché kapalinové chromatografie na kolonkách Sep–Pak. Takto byly získány vodná, metanolová a acetonová frakce. Po ověření elicitačních účinků jednotlivých frakcí budou tyto extrakty děleny dále pomocí HPLC.
V našich testech vyvolávaly extrakty dubové kultury a hydrolyzátů kolagenu změny pH (extrakt dubové kůry změna pH=0,37 a hydrolyzát kolagenu změna pH=0,80). Změny pH byly závislé na koncentraci extraktů. Extrakty ze zázvoru nevykazovaly téměř žádný elicitační účinnek.
Další metodou testování účinnosti elicitorů je stanovení peroxidu vodíku v médiu buněčných suspenzních kultur. V současné době je tato metodika zaváděna v naší laboratoři. Tyto dvě metody budou používány jako rychlý a nenáročný test elicitačních účinků jednotlivých extraktů a frakcí z nich připravených. Dále budou prezentovány účinky elicitorů na expresi genů spojených s obrannými reakcemi rostlin (např. PR1).
Tato práce je podporována projektem č. QH72117 Ministerstva zemědělství a č. ME928 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

P54
Ionty hlinité způsobují rychlý pokles hladiny diacylglycerolu v rostlinných buňkách

Pejchar P., Novotná Z., Schwarzerová K., Valentová O., Martinec J.
Ústav experimentální botaniky AV ČR
martinec@ueb.cas.cz

Ionty hlinité jsou vysoce toxické jak pro živočichy, tak i pro rostliny. Následkem tohoto toxického působení dochází na celém světě k významnému poklesu produkce zemědělských plodin. Molekulární základ toxicity Al3+ v rostlinách je však i přes intenzivní výzkum stále neznámý. Rychlý inhibiční účinek Al3+ na prodlužování kořenů ukazuje na účast signálních kaskád v mechanismu toxického působení Al3+. Cílem prezentované práce bylo studium vlivu Al3+ na fosfolipidový signální systém a zejména na fosfolipasy u tabákové buněčné kultury BY-2.
Fluorescenčně značený fosfatidylcholin byl inkorporován do tabákových buněk BY-2. Po ošetření těchto buněk AlCl3 (0,1 mM) došlo k rychlému snížení produkce značeného diacylglycerolu (DAG). Snížení bylo závislé na koncentraci Al3+ a době jeho působení. V rostlinné buňce stojí DAG v průsečíku několika signálních a metabolických drah a je zřejmě i sám důležitou signální molekulou. Další experimenty ukázaly, že za snížením hladiny DAG stojí pravděpodobně inhibice u rostlin nedávno objeveného enzymu, fosfolipasy C specifické pro fosfatidylcholin (PC-PLC). Naše výsledky ukazují poprvé na roli PC-PLC v reakcích rostlin na stres vyvolaný Al3+.

Tato práce byla podpořena granty MŠMT LC06034 a ME928.

P55
Oligomeric state of photosystem 2 studied by radiation deactivation and native electrophoresis

Kučera T., Herbstová M., Šonská A.
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie
arecuk@natur.cuni.cz

Photosystem 2 (PS2) functional molecular weight (FMW) was studied in thylakoid membranes and spheroplasts of the cyanobacterium Synechococcus elongatus and in leaves, thylakoid membranes and a detergent extract from spinach (Spinacea oleracea), using radiation target analysis (RTA), a method not requiring purification of the protein (or multiprotein complex) of interest. RTA is based on the fact that a protein looses its biological activity exponentially with increasing radiation dose, the exponential factor beeing dependent on the protein's FMW.
RTA with high-energy accelerated electrons was applied to estimate the FMW of PS2 for the following activities: oxygen evolution measured by the Clark oxygen electrode, photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol measured spectrophotometricaly in the presence and in the absence of the artificial electron donor 1,5-diphenylcarbazide. The results show that in spinach, the FMWs of PS2 for the activities requiring water oxidation correspond to the dimeric PS2. Using the artificial donor, FMWs corresponding to monomeric PS2 were obtained. The FMW values differ in the individual materials used in the experiment, decreasing with decreasing complexity of the preparation. In the cyanobacterium, the FMW values also differ depending on the preparation. However, no FMW difference was found between the various activities, the monomeric size beeing sufficient for all of them.
Interpreting these results, it should be kept in mind that RTA does not examine the actual size of PS2, it only shows its minimal size needed for a given activity.
The native electrophoresis separation suggests that both monomeric and dimeric forms of PS2 are physically present in all the preparations used, however, the RTA data show a clear distinction in their contribution to the PS2 activity between spinach and Synechococcus.

P56

Changes in pigment composition of thylakoid membranes in the presence of cadmium ions

Kučera T., Fendrychová A.
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie
arecuk@natur.cuni.cz

Chlorophyll amount is a parameter often used as a reference (expression of sample quantity) when comparing other properties of various plant preparations. When studying the effect of any factor on a given property, therefore, it is important to know whether that factor influences the chlorophyll content of the studied material and what is the quantitative function of such influence.
During a study of Cd2+ ions effect to the activities of photosystem 2 in spinach, we found that chlorophyll content of isolated thylakoid membranes exposed to various Cd2+ concentrations decreases with increasing Cd2+ concentration. In this study, we try to find the relationship between Cd2+ concentration and chlorophyll content. In order to achieve this goal, we exposed isolated thylakoid membranes to various Cd2+ concentrations and studied the pigment composition by means of absorption spectra and reversed-phase liquid chromatography. Similar experiments were carried out also with methanolic extracts of thylakoid membranes to evaluate the possible direct interaction of Cd2+ with chlorophylls e.g. during the routine concentration assays.
We found that cadmium affects the apparent chlorophyll concentration probably in three main ways:
(1) Pheophytinisation of chlorophyll in pigment-protein complexes, leading to lowered concentration estimates. This change shows clear dependence on Cd2+ concentration.
(2) Decreasing the chlorophyll loss when washing the aqueous samples during their preparation, probably strengthening the pigment-protein (or protein-protein) interaction in the pigment-protein complexes. This leads to higher concentration estimates.
(3) Pheophytinisation of chlorophyll in the methanolic extract. This reaction seems to be almost complete already at the lowest Cd2+ concentration used, leading to considerably lowered concentration estimates, if Cd2+ is still present at the time of chlorophyll assay.

P57

Time-resolved absorption of the isolated Pcb protein, and the Pcb-Photosystem I supercomplex from Prochlorothrix hollandica

Durchan M., Fuciman M., Herbstová M., Vácha F., Polívka T.
Ústav fyzikální biologie JU, Nové Hrady; Ústav molekulární biologie rostlin, BC AV ČR, České Budějovice
durchan@umbr.cas.cz

Materials and Methods.
For isolation see the poster Herbstová M. et al. in this section. Steady state absorption,and fluorescence spectroscopy at 77 K were used for spectral characterizations of materials. Transient absorption spectra were measured at room temperature using a femtosecond spectrometer employing amplified Ti:sapphire oscillator (Integra I, Quantronix) as a primary source of femtosecond pulses. Excitation pulses were generated in an optical parametric amplifier (TOPAS, Light Conversion), while a white-light continuum generated in a 3 mm sapphire plate was used as a probe.
Results.
Time-resolved absorption was measured in a broad spectral range from 474 to 716 nm after excitation with ~160 fs laser pulses centered at either 495 nm (carotenoid excitation) or 643 nm (chlorophyll b excitation). All kinetics collected by diode-array detectors were fitted globally. In Pcb proteins, at least three time components were needed to fit excitation dynamics, additional fourth component was required for the Pcb–Photosystem I (PSI) supercomplex.
Conclusions.
1. Carotenoids in Pcb proteins transfer energy from the initially excited S2 state on sub-100 fs time scale. The S1 lifetimes do not indicate any significant changes as compared with those obtained for isolated carotenoids, signaling absence of the S1 channel in Pcb proteins.
2. Besides carotenoids, chlorophyll b efficiently transfers energy to chlorophyll a as demonstrated by ~200 fs depopulation time of excited states of chlorophyll b that is accompanied by a concomitant rise of chlorophyll a bleaching.
3. In the Pcb-PSI supercomplex, the Pcb antenna ring around trimeric PSI [1] transfers energy to the PSI reaction centre with ~20 ps time constant, which is comparable to time constant in a similar light-harvesting system (IsiA protein antenna ring [2]) of Synechocystis.

References.
[1] Bumba L. et al. (2005) Biochim. Biophys. Acta 1708, 1-5.
[2] Melkozernov A.N. et al. (2003) Biochemistry 42, 3893-3903.

P58
Site-directed mutagenesis of maize cytokinin oxidase/dehydrogenace

Kopečný D., Popelková H., Madzak C., Briozzo P., Šebela M., Frébort I., Majira A., Laloue M., Houba-Hérin N.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic; Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan, USA; UMR1238 Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA-CNRS-AgroParisTech,Thiverval-Grignon, France; UMR206 Chimie Biologique, INRA-AgroParisTech, Thiverval-Grignon, France; Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA Versailles, France

FAD-containing cytokinin oxidases/dehydrogenases (CKO) mediate catabolic regulation of cytokinin levels in plants. In general, CKOs catalyze the oxidative breakdown of isoprenoid cytokinins to adenine/adenosine and the corresponding unsaturated aldehydes. CKOs contain covalently bound FAD cofactor and show a dual functionality. Oxygen as well as quinones can re-oxidize FAD reduced during catalytic reaction. Cytokinin substrate binds at the active site in a plug-into-socket mode. However, the binding of electron acceptor is not fully understood. Site-directed mutagenesis in connection with subsequent X-ray analysis provides a powerful tool to study amino acid residues of interest and to clarify their function and importance.
CKO from Zea mays (ZmCKO1) was inserted into pINA1267 vector and expressed in the yeast Yarrowia lipolytica. Thirteen mutants of ZmCKO1 were cloned and analyzed. The mutants of active site residues pointed out the importance of D169 as a crucial catalytic residue. Mutation of residues located at the entrance or inside the active site, strongly affected the substrate specificity, sensitivity to inhibition by N-phenyl-N@-pyridylurea derivatives as well as reaction rates with various electron acceptors. Mutant H105A containing noncovalent FAD was active and showed good activity with isopentenyladenine. Six mutants were purified by gel permeation and ion-exchange chromatography, then crystallized and X-ray data were collected up to 1.8 Ā resolution. Refinement of the crystal structures is underway.

Supported by MSM 6198959215 grant from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and GAČR 522/08/P113 from Czech Science Foundation.

P59
NADP – malic enzyme from tobacco leaves: kinetics and regulation

Doubnerová V., Potůčková L., Ryšlavá H.
Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry
doubnerova@volny.cz

The NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40, NADP-ME) is ubiquitous enzyme with highly conserved amino acids sequences among the various living organisms but with different biological functions. Non-photosynthetic malic enzyme from tobacco (Nicotiana tabacum L., cv. Petit Havana, SR 1) leaves was purified and characterized. Kinetic parameters, reaction mechanism and effective cofactors were established. Moreover regulation possibilities were studied. Several metabolites such as citric acid intermediates, amino acids, metabolites of glycolysis, macroergic compounds and compound participating in lipogenesis, which were proved by some authors as NADP-ME modulators, were tested as possible regulators. Only ATP, GTP and ADP affected NADP-ME activity; these compounds were studied in detail, type of inhibition and inhibition constants were determined.

Acknowledgment: This work was supported by: GA UK 7552/2007; GA UK 7546/2007
Corresponding author: doubnerova@volny.cz

P60
Changes in expression and activity of PEPC and NADP-ME in plants infected with Potato virus Y

Ryšlavá H., Doubnerová V., Müller K., Čeřovská N.
Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry; Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic
rysl@natur.cuni.cz

Biotic stress affects the plant metabolism, specific defence reactions occurs and also fluxes through primary and secondary metabolic pathways are changed. In tobacco plants (Nicotiana tabacum L.) under biotic stress caused by viral infection increased activities of NADP-dependent malic enzyme (NADP-ME, EC 1.1.1.40) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) were found. These enzymes were tested at the transcriptional, translational and posttranslational levels. The enhancement of NADP-ME activity is in relation with enhanced amount of NADP-ME protein and amount of NADP-ME mRNA. Contrary, PEPC is regulated more likely by phosphorylation than by synthesis de novo. The relevance of these enzymes in plants under stress conditions will be discussed.

Acknowledgment: This work was supported by: GA UK 7552/2007; GA UK 7546/2007

P61
Vliv pražení na obsah akrylamidu v obilovinách a sladech

Jirsa O., Martinek P., Večerková L., Bucher P., Bartáčková V., Hajšlová J.
Agrotest fyto, s.r.o.; Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
jirsa@vukrom.cz

Problematika výskytu akrylamidu (AA) v potravinách a možnosti jeho eliminace v potravinách mají velkou prioritu. AA vzniká během tepelného zpracování během Maillardovy reakce. Mezi potraviny upravované vysokými teplotami během zpracování patří pražené obiloviny. Byl zjišťován obsahu prekurzorů AA (asparagin, glukosa, fruktosa, sacharosa) ve výchozí surovině a vliv parametrů pražení na obsah AA v obilovinách a sladech. Byly hodnoceny odrůdy jarního ječmene Prestige, Bojos, odrůdy ozimé pšenice Ebi a Rapsodia a žito Daňkovské Nové. Odrůdy ječmene byly pěstovány po třech předplodinách (obilovina, ozimá řepka, cukrovka), ostatní plodiny jen po předplodině obilovině. Všechny odrůdy byly pěstovány při třech technologiích (nízká, střední a vysoká), lišících se úrovní hnojení, použitím morforegulátorů a fungiciců. Vzorky zrna byly praženy na laboratorní pražičce z výchozí teploty 150 °C na maximální teplotu 190 °C do dosažení standardní barvy. Pro stanovení vlivu teploty a doby pražení na obsah AA byly vybrány odrůdy s odlišným obsahem N-látek. Během pražení docházelo postupně ke zvyšování obsahu AA a následně docházelo obvykle k jeho poklesu se zvyšující se teplotou a rovněž i dobou pražení. Byly zaznamenány specifické reakce jednotlivých plodin a odrůd na teplotu a dobu pražení. U ječmene se pražením vytvářelo obecně nejnižší množství AA, dál následovalo žito, nejvíce AA bylo u pšenice. U žita došlo k nejvyššímu nárůstu AA po krátké době pražení 15 minut při teplotě 150°C. To ukazuje na podobnost s průběhem pražením kávy. U pšenice pokles obsahu AA s dobou pražení a teplotou nebyl tak výrazný jako u žita. Vliv předplodiny a pěstitelské technologie průkazně neovlivňoval obsah AA. Byl zjištěn výrazný vliv plodiny a genotypu na tvorbu a průběh tvorby AA v průběhu pražení. U vzorků průmyslově pražených sladů byl zaznamenán vysoký obsah u AA a u tmavých pražených sladů, používaných pro dobarvování potravin. Práce byla podpořena projektem MŠMT České republiky: 2B06168.

P62
Isolation, sequencing, and genetic diversity of microsatellite loci from Begonia x tuberhybrida Voss. Germplasm

Wiesner I., Wiesnerová D., Demelová B., Třasáková J.
Biologické centrum AVČR, v.v.i., Ústav molekulární biologie rostlin
wiesner@umbr.cas.cz

The genus Begonia with its 1,500+ species and 10,000+ hybrids and cultivars is one of the most important crop for floriculture industry. Among vast amount of species especially Andean begonias got particular horticultural merit to produce diverse tuberous group of Begonia x tuberhybrida. An understanding of the magnitude and patterns of genetic diversity in Begonia using DNA markers has important implications for breeding programs and conservation of the world genetic resources. Therefore, we isolate and sequence new polymorphic microsatellite loci suitable for identification of B. x tuberhybrida Voss. breeding genotypes and cultivars [1] using streptavidine-biotine hybrid-capture strategy for construction of microsatellite-enriched libraries, and [2] using amplification and sequencing of heterologous microsatellite loci from sister Begonia species. Experimental focus is oriented especially to describe genetic diversity and to quantify identification informativeness of isolated microsatellites for newly developed original Czech B. x tuberhybrida cultivars, cv. Bergine Red, and cv. Bergine Yellow.

Acknowledgements. This study is supported by Targeted Research DP3-PP2 of the National Research Program, project no. 1QS500510566 of the AS CR.

P63
Study of the transcription variability of mitochondrial genes in Silene vulgarit

Müller K., El Ansary H. O., Štorchová H.
Institute of Experimental Botany, Academy of Science of Czech Republic
muller@ueb.cas.cz

Unlike animals, plant mitochondrial (mtch) genome is large and dynamic. Frequent genomic rearrangements, disruption of gene continuity, incorporation of chloroplast and nuclear DNA, transfer of mtch genes into the nucleus are prominent processes taking place in plant mitochondria genomes. We chose Silene vulgaris, a model plant species for the study of gynodioecy, to monitor mitochondrial genome diversity.
To study variation of mtch DNA structure and gene expression profiles, Southern and Northern hybridization with non-radioactively labeled probes, derived from several mtch genes, are applied. We selected atp1, atp6, atp9, cox1, cox2, nad3, nad5 and cob genes for our study. RNA was isolated from the flower buds of the S. vulgaris plants collected in Europe, Asia and North America and grown in the greenhouse.
The transcription profiles of most of the genes varied in dependence on plant mtch DNA haplotype. We chose the cob (cytochrom b) gene for more detailed transcription analyzis. RT PCR revealed that a cotranscription of cob with an adjacent unknown open reading frame was responsible for variable banding pattern detected by Northern hybridization in some haplotypes. We performed additional experiments to know, whether cotranscription was also involved in high transcript variation observed with other mtch genes.

Financial support was provided through the grant MŠMT LC06004

Přednášky

O20
Poučí nás lidské embryonální kmenové buňky o mechanismech vzniku nádoru?

Hampl A.
Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Czech Republic
Department of Molecular Embryology, Institute of Experimental Medicine, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic
Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine-Hematooncology, University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Czech Republic
ahampl@med.muni.cz

Human embryonic stem cells (hESC) are immature cells derived from human blastocyst-stage embryos that can be indefinitely propagated in culture and can also be induced to differentiate into all mature cell types. Recently, several studies have reported accumulation of various types of alterations to DNA of hESC. Although these abnormalities are believed to provide hESC with growth advantage similar to cancer cells, neither this fact nor underlying mechanisms have been experimentally demonstrated. We addressed whether abnormal metabolism of mitotic apparatus and/or improper functioning of checkpoint pathways may contribute to genomic instability of hESC. We show that hESC are typical by high frequency of mitoses with supernumerary centrosomes, which participate in formation of multipolar spindles. Although centrosome amplifications occur in high frequency (10-30%) in hESC in early to mid passages they become suppressed in hESC in later passages (less then 5%). We have found that Aurora A and CDK2, normally involved in centrosome metabolism, are overabundant and highly active in hESC. Correspondingly, chemical inhibition of CDK2 in hESC reduces the percentage of mitoses with supernumerary centrosomes. Both the integrity and number of centrosomes seem to be monitored by signaling pathways that employ established molecules involved in sensing and executing response to DNA damage. We show that at least some components of such pathways are developed and operative in hESC. Upon damage, hESC accumulate p53 protein that is capable of transactivation of its target genes, they phosphorylate Chk2, degrade their CDC25A phosphatase, and delay their cell cycle. We propose that understanding of mechanisms involved in harboring early alterations to genome of originally genetically normal hESC, and their link to the changes in hESC phenotype in particular, will shed some light on initial steps of carcinogenesis.
Supported by: MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703, 1M0538, 1QS500040507, AVOZ50040507, AVOZ50040702, NR/9293-3/200

O21
Cílené změny v expresi protein kináz a protein fosfatáz řídících znovuzahájení a dokončení meiózy myších oocytů

Motlík J., Šašková A., Šolc P., Baran V., Kubelka M.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AVČR, Rumburská 89, 277 21 Liběchov; Ústav fyziologie zvierat, SAV, Šoltesovej 4-6, 040 01 Košice, Slovensko
motlik@iapg.cas.cz

Meióza je klíčovým procesem pro uskutečnění homologní rekombinace, která je hlavním zdrojem genetické rozmanitosti, a pro věrné předání genetické informace budoucím generacím. Zrání savčích oocytů je současně jedinečným modelem pro studium buněčného cyklu a je řízeno souhrou kinázových a fosfatázových aktivit. Naše experimenty prokázaly, že pro znovuzahájení jaderného zrání oocytů, které je řízeno cyklin-dependentní kinázou CDK1, je klíčová nejen fosfatáza CDC25B, ale také fosfatáza CDC25A. CDC25A protein je přítomen v oocytech ve stádiu zárodečného váčku (GV), ale jeho úroveň podstatně klesá ve stadiu metafáze I (MI) a metafáze II (MII). Mikroinjekce GFP-CDC25A mRNA do GV oocytů s vysokou hladinou cAMP vedla ke znovuzahájení meiózy a k aktivaci CDK1. Tyto pokusy jasně ukazují, že obě fosfatázy, CDC25A a CDC25B, participují na znovuzahájení meiózy. Mikroinjekce dlouhé (650 bp) dsRNA vyvolávalo efektivní RNA interferenci (RNAi) pro CDC25A mRNA. CDC25A RNAi způsobila blok na úrovni MI-MII přechodu. Výsledky dokazují specifickou roli CDC25A v meióze.
Aurora kináza A (AURKA) je lokalizována na centrosomu a je klíčová pro jeho zrání, stejně jako pro výstavbu dělícího vřeténka u somatických buněk. U oocytů je AURUKA v MI lokalizována v centrech organizujících mikrotubuly (MTOXs). Přítomnost aktivní AURUKA (pT288) na MTOXs není vázána na aktivaci CDK1. Zatímco overexprese AURUKA vede k multiplikaci MTOXs a k formování abnormálního MI vřeténka, AURUKA RNAi experimenty prokázaly nezbytnost této kinázy jak pro znovuzahájení meiózy, tak pro funkčnost dělícího vřeténka.
Na příkladu CDC25A fosfatázy a Aurora A kinázy jsme ukázali, že mikroinjekce specifické mRNA i dlouhé dsRNA je velmi efektivní metodický přístup, který přispívá k objasnění složité interakce protein kináz a fosfatáz, které se podílejí jak na znovuzahájení meiózy, tak na dosažení MII s vyděleným prvním polárním tělískem, tedy na vytvoření oplození schopné samičí gamety.

O22
Vítězka Drobnicova memoriálu (A. Ohraďanová): Hypoxia regulates expression of endosialin, a marker of tumour angiogenesis

Ohraďanová A., Gradin K., Baráthová M., Zaťovičová M., Holotňaková T., Kopáček J., Poellinger L., Pastoreková S., Pastorek J.
Centre of Molecular Medicine, Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic; Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
viruohra@savba.sk

Endosialin is a member of a glycoprotein family involved in cell-cell interactions. It was identified as one of the most differentially expressed markers of cells lining tumour blood vessels and adjacent fibroblast-like stromal cells of tumours vs normal tissue (hence its alternative name, tumour endothelial marker 1, TEM1). It has been functionally implicated in angiogenesis, but the factors that control its expression have remained unclear. Since insufficient delivery of oxygen is a driving force of angiogenesis in growing tumours, we investigated whether hypoxia regulates endosialin expression. Here we demonstrate that endosialin gene transcription is induced by hypoxia predominantly via a mechanism involving hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) cooperating with the Ets-1 transcription factor. We show that HIF-2 activates the endosialin promoter both directly, through binding to a hypoxia response element adjacent to an Ets-binding site in the distal part of the upstream regulatory region, and indirectly, through Ets-1 and its two cognate elements in the proximal promoter. Our data also suggest that the SP1 transcription factor mediates responsiveness of the endosialin promoter to high cell density. These findings elucidate important aspects of endosialin gene regulation and provide a rational frame for future investigations towards better understanding of its biological significance.

Supported by VEGA 2(6112/26)

O23
Genová exprese Heat shock proteinu 110 je zvýšená během progrese kolorektálního karcinomu

Slabý O., Sobková K., Garajová I., Svoboda M., Fabian P., Šachlová M., Šmerdová T., Knoflíčková D., Vyzula R.
Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno; Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno
slaby@mou.cz

Kolorektální karcinom (CRC) patří v České republice k nejčetnějším nádorovým onemocněním. Léčebný plán je pacientům indikován na základě stratifikace do klinických stádií vycházející z TNM klasifikace. Zatímco u I. a IV. klinického stádia je prognostický význam klasifikace jednoznačný, u skupiny pacientů ve II. (bez postižení regionálních lymfatických uzlin – RLU) a III. klinickém stádiu (s diseminací do RLU), tomu tak není. Příčinou je časté podhodnocení N stádia lymfatických uzlin z důvodu nedostatečného počtu odebraných a/nebo vyšetřených uzlin. Předpokládáme, že molekulární charakterizace nádorů metastazujících do RLU pomocí profilů genové exprese umožní detekci postižení RLU tam, kde selhávají konvenční diagnostické metody. Do studie bylo zahrnuto 20 pacientů s histologicky potvrzeným sporadickým CRC (10 pacientů ve stádiu II, 10 ve stádiu III). V tumorech jsme stanovili relativní expresi 440 genů s významem v nádorové biologii pomocí nízkohustotních oligonukleotidových čipů SuperArray. Validace výsledků byly provedeny na na nezávislé skupině 29 pacientů s CRC (I.stádium – 7, II.stádium – 13, III.stádium – 4 a IV.stádium 5 pacientů) pomocí kvantitativní Real-Time PCR. VÝSLEDKY: Pomocí t-testu (alfa = 0,05) a metody SAM byly identifikovány 3 geny (HSP110 – Heat shock protein 110, HYOU1 – Hypoxia up-regulated 1, TCTP – Translationally controled tumor protein) s více než dvojnásobnou expresí u pacientů s diseminací do uzlin. Gen pro Hsp110 jsme podrobili důkladnějšímu ověření. Poprvé jsme identifikovali statisticky významné zvýšení hladin Hsp110 na úrovni mRNA v CRC oproti párovým kontrolním sliznicím ($p<0,0001$). Podařilo se rovněž potvrdit trend ve změnách exprese genu pro Hsp110 mezi skupinami pacientů s lokalizovaným a diseminovaným onemocněním pozorovaný při čipových analýzách ($p=0,03$). Up-regulace genu Hsp110 byla dle Kaplan-Meierovy analýzy spojena také s kratším celkovým přežitím pacientů s CRC. Všechna výše uvedená pozorování byla u CRC učiněna poprvé.

O24
Histonacetyltransferasy PCAF a hGCN5 jako koregulátory aktivity transkripčního faktoru microphthalmia

Ondrušová L., Vachtenheim J.
Laboratoř molekulární biologie, FN Bulovka, 3. LF UK Praha
jivach@upn.anet.cz

Transkripční faktor MITF (microphthalmia-associated transcription factor) je exprimován v několika buněčných typech (melanocyty, osteoklasty a pigmentové buňky sítnice), kde má klíčovou úlohu v buněčné diferenciaci. V melanocytech, které exprimující jeho specifickou isoformu, je MITF centrálním transkripčním regulátorem udržujícím identitu buněčné linie, aktivátorem transkripce diferenciačních markerů a reguluje i proliferaci a apoptosu. Zjistili jsme, že dva transkripční koaktivátory, histonacetyltransferasy (HAT) PCAF a hGCN5 interagují s MITF in vitro i v buňkách. Vazba je přímá, nezávislá na tvorbě komplexu např. s proteinem p300, známým koaktivátorem MITF, a je pro ni nutná oblast bHLH v molekule MITF. Ektopická exprese PCAF i hGCN5 však neaktivuje, ale naopak inhibuje cílový promoter pro MITF, promoter pro melastatin, který z mnoha cílových promoterů nejcitivěji reaguje na hladiny MITF. Další cílové promotery pro MITF jsou rovněž reprimovány, ale celkově méně silně než melastatin a navíc rozlišují mezi PCAF a hGCN5. Transfekce siRNA namířené proti PCAF aktivuje promoter pro melastatin v melanomových buňkách, což ukazuje, že endogenní hladina PCAF negativně reguluje aktivitu MITF. HAT-deficitní mutanty PCAF i hGCN5 reprimují melastatin překvapivě stejně dobře jako nemutované (wt) formy, což ukazuje na nezávislost represorové funkce na HAT aktivitě, a to i přesto, že wt PCAF acetyluje MITF in vitro. Výsledky tedy ukazují, že PCAF a hGCN5 působí jako negativní regulátory transkripční aktivity MITF, a to nezávisle na své histoacetyltransferasové aktivitě, a jsou tedy i potenciálními koregulátory klíčových procesů jako jsou diferenciace, proliferace a apoptosa v melanocytech a melanomových buňkách.

O25
Mapování signální adhezní dráhy v leukemických buňkách JURL-MK1 po účinku chemoterapeutik

Pluskalová M., Grebeňová D., Kuželová K., Halada P., Hrkal Z.
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha
pluskalova@uhkt.cz

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klinicky charakterizována masivním rozšířením zralých leukocytů i nezralých progenitorů a prekurzorů v periferní krvi. Tyto leukemické buňky vykazují sníženou adhezi ke stromálním buňkám a k ECM a předčasně opouštějí kostní dřeň. Je to způsobeno porušením regulačních signálů, které jsou vysílány normálně adherujícími hematopoetickými prekurzory. Molekulárně je pro CML charakteristická chromozomální translokace t(9:22), kterou vzniká Filadelfský chromozom. Výsledkem je permanentně aktivovaná onkogenní kináza Bcr-Abl, která zasahuje do funkcí mnoha proteinů i celých signálních drah. Bcr-Abl se přímo váže na aktin a mění expresi či aktivitu mnoha proteinů fokálních adhezí (např. paxillin, FAK, RhoA). Způsobuje tím změny ve struktuře aktinového cytoskeletu a mění adhezní vlastnosti buněk CML. Imatinib mesylát a derivát geldanamycinu 17-AAG se úspěšně používají v léčbě CML. Inhibují aktivitu (imatinib) nebo stabilitu (17-AAG) kinázy Bcr-Abl.

Metodami dvourozměrné elektroforézy, hmotnostní spektrometrie a imunoblotu jsme sledovali různé proteiny, které se účastní regulace aktinového cytoskeletu. Složení cytoplazmatického aktinu do mikrofilament ovlivňují interakce aktin – kofilin a aktin – tropomyosin. Kofilin pracuje jako aktin-depolymerizující faktor, pokud není fosforylovaný. Po účinku obou terapeutik se štěpí kináza ROCK-1, která fosforyluje kinázu LIM-K1, jež je odpovědná za fosforylaci kofilinu. V důsledku toho se defosforyluje kofilin, a tak se může aktivovat a destabilizovat strukturu aktinového cytoskeletu. K té přispívá i pokles tropomyosinu, jenž mechanicky stabilizuje aktinová vlákna. Polymerní aktinová vlákna jsme značili FITC-faloidinem a sledovali metodami průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Po účinku obou terapeutik jsme pozorovali rozvolnění aktinových vláken a snížení adheze k fibronektinu.

Práce vznikla za podpory grantu NR/9243-3 Ministerstva zdravotnictví ČR.

O26
Vítěz ceny J. V. Koštíře (Petr Heneberg): Nádorové kmenové buňky: Převrat v názorech na vznik a progresi nádorového bujení

Heneberg P.
Pracoviště: Ontario Cancer Institute – University Health Network, 101 College St., Toronto, ON M5G 1L7, Kanada & Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Ruská 87, 100 00 Praha 10
e-mail: pheneber@uhnresearch.ca

Uniformní klony mutovaných buněk tvořící nádor – tuto vousatou teorii vyvrací stále intenzivnější výzkum nádorových kmenových buněk, minoritní buněčné populace v rámci nádoru, která zodpovídá za jeho růst a metastázující aktivitu. Nález nádorových kmenových buněk znamenal naprostý převrat v našem chápání vzniku a progrese nádorového bujení. Poprvé byly identifikovány roku 1997 při studiu akutní myeloidní leukémie a popsány jako CD34-pozitivní a CD38-negativní populace. Když byly tyto buňky odděleny od ostatních a v malém množství přeneseny do myší, bylo zjištěno, že samy o sobě mají schopnost iniciovat vznik leukémie v myších v plném rozsahu. Již záhy po jejich identifikaci se na ně upřela pozornost stovek vědeckých kapacit celého světa. Roku 2003, bylo zjištěno, že nádorové kmenové buňky nejsou výsadou leukemických buněk, ale že hrají svou roli i u pevných nádorů. Selekční kritéria stále nejsou pevně stanovena, v závislosti na designu dané studie se využívá zejména selekce na přítomnost molekul CD44, CD133, či CD166, a naopak na nepřítomnost molekuly CD24. Nádorové kmenové buňky bývají zároveň odolnější vůči chemoterapeutikům. Jejich přítomnost tak zároveň vysvětluje proč tak často dochází k relapsům nemoci po chemoterapii pacientů postižených nádorovým bujením.
Objev a charakterizace nádorových kmenových buněk je jednou z nejvýznamnějších novinek biologie posledního desetiletí. Důraz je dnes kladen především na jejich schopnost tvorby neadherentních sférických kolonií a schopnost tvorby obnovy nádoru při xenotransplantaci jen malého množství buněk. Z terapeutického hlediska je důležité, že se již dnes ukazuje možné použití blokujících protilátek proti povrchovým receptorům nádorových kmenových buněk (např. CD44). Selektivní inhibice nádorových kmenových buněk je velmi slibným směrem výzkumu směřujícím k potlačení či úplné eliminaci tvorby metastáz zhoubných nádorů.
Studie podpořena výzkumným záměrem MSM0021620814 a postdoktorandským stipendiem Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

Postery

P64

Expression of apoptosis related genes in human peripheral blood lymphocytes treated with suberoyl anilide hydroxamic acid

Kalousek I., Brodská B., Otevřelová P.
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha
Ivan.Kalousek@uhkt.cz

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat, Zolinza) is an synthetic antineoplastic agent having histone deacetylase inhibitor activity acting through the epigenetic control of gene expression. The drug is currently in phase II of clinical trials for different types of cancer. With the aim of understanding the complexity of SAHA action including possible side effects on homeostasis of hematopoietic cells, we have investigated apoptotic activities induced by SAHA in normal human peripheral blood lymphocytes cultured in vitro. Cellular mRNA and protein levels were examined using quantitative RT-PCR and immunoblots. The caspase activation and the progress of apoptosis was indicated by flow cytometry. Our data suggest that SAHA, at clinically used concentrations, triggered intrinsic apoptotic pathway accompanied by collapse of mitochondrial membrane potential, cytochrome c release and subsequent activation of caspase 9 and caspase 3. The apoptotic process was opened by induction of expression of pro-apoptotic genes Bim and Bmf followed by activation of proteins Bak and Bax which mediates the mitochondrial membrane permeabilization. The Bak/Bax activation was likely promoted, in certain manner, by silencing of relatively low expressions of both, apoptotic antagonist Bcl-w and caspase inhibitor survivin. Our data revealed intriguing mechanism of moderation of apoptotic death in healthy lymphocytes. Simultaneously with Bim activation the expression of c-Myc gene was hardly downregulated. The c-Myc, generally functioning as mediator of Bim activity thus controls the progress of apoptotic process in normal healthy lymphocytes. Like other histone deacetylase inhibitors, SAHA was found to upregulate the transcription of p21Waf1 gene. The p21Waf1 protein, that stabilizes both, the caspase 3 inactive pro-enzyme and the apoptosis inhibitor IAP1 contributes to apoptosis rate deceleration.

Supported by grant IGA VZ 00023736 from Ministry of Health of the Czech Republic

P65

Characterization of gene cluster for polyketide antibiotic auricin in Streptomyces aureofaciens CCM3239

Kutaš P., Nováková R., Fecková L., Bistáková J., Kormanec J.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences
peter.kutas@gmail.com

Streptomyces are soil bacteria, which have been extensively used in the pharmaceutical industry for the past decades as a source of bioactive natural products. Many of them are clinically important products belonging to the aromatic polyketides. These secondary metabolites are usually synthetized by type II polyketide synthase (PKS). The entire antibiotic gene, aur1, cluster encoding an aromatic type II PKS in Streptomyces aureofaciens CCM3239 that was responsible for angucycline antibiotic auricin was cloned and characterized. The part of the aur1 cluster was placed under the control of strong ErmEp promoter and integrated in the chromosome of heterologous host Streptomyces coelicolor. Analysis of the expression revealed the aur1 cluster was expressed in this strain. However, the production of auricin was weaker comparing to the production of the wild-type strain.

Acknowledgement. This work was supported by Science and Technology Assistance Agency under the contract No. APVV-0017-07 and the VEGA grant 2/6010/26 from Slovak Academy of Sciences.

P66
Link between regulation of two stress response sigma factors SigH and SigB in Streptomyces coelicolor

Ševčíková B., Mazuráková V., Kormanec J.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, 845 51 Bratislava, Slovak Republic.
Beatrica.Sevcikova@savba.sk

Streptomyces coelicolor is soil bacterium that undergoes a complex cycle of morphological differentiation. Genes involved in osmoadaptation and regulations of differentiation include those encoding sigma factors. Previously we identified a gene in S. coelicolor A3(2) encoding a stress-response sigma factor SigH with a dual role in salt stress-response and morphological differentiation. However, S. coelicolor contains eight close homologues of SigH, and other homologue, SigB, has also been shown to have a similar dual function. SigH and sigB are parts of operons, which contain genes encode homologue of anti-sigma factor and protein with unknown function. To clarify the function of sigB and sigH operons, stable null mutants were prepared in S. coelicolor by deletion of whole sigB and sigH operons. Phenotypic analysis showed that deletions of both operons had opposite effect in differentiation as disruption of particular sigma factor genes. Both mutants abundantly and precociously sporulated. Complementation analysis with a part of the operons revealed a specific function of particular genes in these operons. Analysis of the transcription and translation of both operons during differentiation and stress conditions revealed a dominant role of SigB in salt-stress response and SigH in late stages of differentiation. The regulons of both sigma factors were identified and characterized. Several genes were under the control of both sigma factors that indicated a partial cross-regulation.

Acknowledgement. This work was supported by the VEGA grant 2/6010/26 from Slovak Academy of Sciences.

P67
The genes encoding gama-butyrolactone autoregulator-receptor system in Streptomyces aureofaciens CM3239

Fecková L., Nováková R., Kutaš P., Kormanec J.
Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava
Lubomira.Feckova@savba.sk

Biosynthetic pathways leading to the formation of secondary metabolites in wide variety of Streptomyces species are under strict regulation by internal and external signals.
Gamma-butyrolactones are small diffusible signaling molecules which regulate secondary metabolism and, sometimes, sporulation in actinomycetes by binding to specific receptor proteins, causing their dissociation from DNA targets and releasing the latter from transcriptional repression. We have identified two new genes (sagA and sagR) in the upstream region of the aur1 cluster for biosynthesis of angucycline-like antibiotics auricin of Streptomyces aureofaciens CCM 3239. Their amino acid sequence exhibits strong similarity to gamma-butyrolactone autoregulator putative biosynthetic (afsA family) and receptor genes.
Disruption of sagA by the Redirect strategy resulted in failure of the production of auricin and indigoidine-like blue pigment. In contrast, disruption of sagR resulted in earlier and increased auricin and indigoidine-like blue pigment production. Analysis of expression by S1-nuclease mapping revealed that sagR depends upon sagA and vice-versa. Finally, SagR and SagA may play an important role in the signal transduction mechanisms that trigger secondary metabolism in S. aureofaciens CCM3239.
Acknowledgement. This work was supported by Science and Technology Assistance Agency under the contract No. APVV-0017-07 and the VEGA grant 2/6010/26 from Slovak Academy of Sciences.

P68

Identification of promoters recognized by RNA polymerase containing Staphylococcus aureus sigma factor SigH and transcriptional characterization of sigH operon

Homerova D., Kormanec J.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, 845 51 Bratislava, Slovak Republic.
Dagmar.Homerova@savba.sk

Staphylococcus aureus sigma factor of RNA polymerase, SigH, is involved in regulatory network of transcription controlling the genetic competence genes. For identification of promoters recognized by this sigma factor we used a method previously used for identification of regulons of several sigma factors from different bacteria and verified for identification of Staphylococcus aureus promoters recognized by sigma factor SigB. Our results revealed two promoters which directed genes comGA and comEA, encoding proteins involved in the natural genetic competence. Transcriptional start points (TSPs) of the promoters determined by S1-nuclease mapping were identical to TSPs in Sthaphylococcus aureus. In order to investigate the expression of the sigH operon (cysE, cysS, yazC, yacO, yacP, sigH) and expression of the downstream secE gene, primer extension analysis was performed using three 5'-labelled reverse oligonucleotide primers and RNA isolated from S. aureus. According our results there are at least five promoters upstream the sigH. There is a strong secEp promoter downstream sigH and upstream secE that is recognized by the principal sigma factor.

Acknowledgement. This work was supported by the VEGA grant 2/6010/26 from Slovak Academy of Sciences.

P69

Intracellular calcium balance in chronic kidney disease patients: effect of vitamin D supplementation

Lajdová I., Spustová V., Okša A., Chorvátová A., Chorvát D. Jr., Štefíková K., Dzúrik R.
Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie, Slovenská zdravitnícka univerzita, Bratislava, Slovenská republika; Research Centre, CHU Sainte-Justine, Department of Pediatrics, University of Montreal, Canada; Medzinárodné laserové centrum, Bratislava, Slovenská republika
ingrid.lajdova@szu.sk

INTRODUCTION. Chronic renal disease (CKD) has been referred to as a state of cell calcium toxicity. The aim of this study was to investigate the status of free intracellular calcium concentration ([Ca2+]i), intracellular calcium reserves and capacitative calcium entry in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of CKD patients, and to determine the effect of vitamin D3 supplementation on these parameters.

METHODS. The study involved 44 patients with CKD stages 2-3. 27 patients were treated with vitamin D3 (5000 IU/week) for 12 months. Control values of investigative parameters were determined in 70 healthy volunteers. [Ca2+]i was measured using Fluo-3 AM fluorimetry. Intracellular calcium reserves were emptied after application of thapsigargin (Tg), a specific inhibitor of endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase. 2-Aminoethyldiphenyl borate (2APB) was used to examine the capacitative calcium entry.

RESULTS. [Ca2+]i of CKD patients was substantially higher in comparison with healthy subjects: 124 (118 – 126) nmol/l vs 102 (98 – 103) nmol/l, $P < 0.001$. The calcium concentration of Tg-sensitive stores and capacitative calcium entry were significantly increased in CKD patients. A 12- month vitamin D3 supplementation caused a significant decrease in [Ca2+]i without substantial changes in intracellular calcium reserves and capacitative calcium entry.

CONCLUSIONS. Our results demonstrate that: 1) [Ca2+]i and the effect of Tg were significantly increased in early stages of CKD; 2) intracellular Tg-sensitive calcium reserves and capacitative calcium entry of CKD patients were significantly higher in comparison with healthy volunteers; 3) after vitamin D3 supplementation, the elevated [Ca2+]i in CKD patients returned to value comparable with those in healthy subjects; 4) vitamin D3 supplementation did not affect intracellular calcium reserves and capacitative calcium entry.

Supported by Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVT-21-033002

P70
Differences in TRAIL-induced apoptosis during adherent and nonadherent cultivation

Kočí L., Hýžďalová M., Vaculová A., Hofmanová J., Kozubík A.
Institute of Biophysics, Academy of Sciences of Czech Rep. v.v.i., Brno; Masaryk University, Faculty of Science, Brnokoci@ibp.cz

Colonic epithelial cells are shed into intestinal lumen at the top of the crypt and die by detachment-induced apoptosis (anoikis). Resistance of transformed epithelial cells to anoikis promotes cancer cell invasion and metastasis. We have studied the effects of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) on cytokinetic parameters and adhesive properties of the human colon cell lines derived from normal foetal FHC and adenocarcinoma HT-29 tissues in association with anoikis induction.
To mediate anoikis, we established the model of nonadherent cell cultivation. Our results indicated that the HT-29 cells are more sensitive to TRAIL-induced apoptosis than the FHC cells during adherent cultivation. We have investigated differences in TRAIL receptor expression during both type of cultivation. Moreover, we determined the changes in expression and activation of two key kinases (focal adhesion kinase – FAK and integrin-link kinase – ILK) involved in cell adhesion. We have supposed an association between activation of adhesion kinases and PI3/Akt prosurvival pathways, which could be responsible for the decreased sensitivity of the colon cells to the TRAIL action during the nonadherent cultivation.
Our data showed that nonadherent type of cultivation induced decrease of the TRAIL-mediated apoptosis of colon epithelial cells compared to adherent cultivation. This effect can be connected with the activation of PI3/Akt pathway.

This work was supported: Nos. 524/07/1178 and 301/07/1557 GACR and No. 1QS500040507 ASCR.

P71
Studium funkce proteinu UBL5 v buňce

Švéda M., Knejzlík Z., Ruml T.,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Martin.Sveda@vscht.cz

Protein UBL5, strukturní homolog ubikvitinu, je tvořen 73 aminokyselinovými zbytky, a s ubikvitinem sdílí 23% sekvenční homologii. Na rozdíl od ubikvitinu neobsahuje protein UBL5 na C-konci diglycinový, ale dityrosinový motiv – 71-YYQ-COOH. Doposud publikované studie popisují vliv proteinu HUB1p (kvasinkový ortholog UBL5) na sestřih pre-mRNA v S. cerevisiae; a také na lokalizaci proteinu SNU66p, který je součástí komplexu proteinů podílejících se na tvorbě spliceosomu. Tato studie je zaměřena na studium funkce lidského proteinu UBL5 v savčích buňkách HEK 293T. Pomocí transientně exprimovaného proteinu UBL5-YYQ a jeho delečních variant UBL5-YY/dYY jsme prokázali vliv C-koncového dityrosinového motivu na jadernou lokalizaci proteinu UBL5, která měla u divokého typu UBL5-YYQ 3 odlišné fenotypy: tečkový, agregační a difúzní, kdy charakter a počet teček u prvního typu vykazoval vysokou podobnost s Cajaliho tělísky. Zatímco divoký typ proteinu UBL5 byl lokalizován v jádře, jeho deleční mutant UBL5-dYY se nacházel pouze v cytoplazmě. Hypotézu možné kolokalizace proteinu UBL5 a Cajaliho tělísek jsme s pozitivním výsledkem ověřili pomocí koexprese UBL5-YYQ a proteinového markeru Cajaliho tělísek – coilinu. Navíc jsme pomocí fúzního proteinu DsRed2-Mito prokázali kolokalizaci delečního mutantu UBL5-dYY a mitochondrií.
Naše experimentální data poukazují na úzký vztah proteinu UBL5 a buněčného jádra. Předpokládáme možnost účasti proteinu UBL5 v metabolismu snRNP a tvorbě subjaderných domén typu Cajaliho tělísek. Hypotézy o roli UBL5 při sestřihu pre-mRNA či v energetickém metabolismu buňky, jsou jen daty podpořené logické asociace, jejichž potvrzení či vyvrácení je předmětem dalších studií.

P72

Cloning, expression, purification and crystallization of domains of human ryanodine receptor

Hlinková V., Hostinová E., Gašperík J., Borko L., Zahradníková A., Ševčík J.
Institute of Molecular Biology SAS, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava; Institute of Molecular Physiology and Genetics SAS, Vlárska 5, 833 34 Bratislava
Vladena.Hlinkova@savba.sk

Human ryanodine receptor 2 (RyR2) is one of the three isoforms of ryanodine receptor, ion channels that mediate Ca2+ release from intracellular calcium stores. RyR2 is responsible for releasing Ca2+ ions necessary for contraction in cardiac myocytes. It is a large homotetramer, composed of four ~6000 amino acid subunits. Because the whole molecule is very large, we identified cloned, purified and crystallized individual domains of RyR2. The bioinformatics program Pfam predicted 14 domains in each RyR2 subunit. According to Pfam, secondary structure prediction and amino-acid sequence comparison with RyR proteins from other organisms and with the related ion channels we have chosen the first three Pfam domains.
cDNA sequence coding for the residues 1 – 759 (clone HC4, Tunwell et al., Biochem J. 318:477-487, 1996) was obtained from Prof. F.A. Lai (University of Cardiff). Three constructs, 1-606, 230-606 and 409-606, were prepared in fusion with Nus-protein to increase solubility. The constructs 1-606 and 409-606 were also cloned without the fusion partner into the pEt28a expression vector. All clones were verified by DNA sequencing. All constructs were expressed in E. coli, BL21 (DE3) at optimized temperature, IPTG concentration and expression time. His-Tag purification was used as the main purification step. The fragments 1-606, 409-606 and 409-606-Nus performed best regarding protein expression and purification. To improve the solubility of fragments 1-606 and 409-606, 0.5 % Sulfobetaine was used. Crystallization experiments for the fragment 409-606 were performed with the crystallization kit Structure Screen 1 (Molecular Dimensions). First crystals with dimensions ~0.15 mm were obtained in 2 M ammonium sulfate, 100 mM sodium acetate, pH 5.5. Crystallization of other fragments and testing their diffracting power is under way.
This work was supported by the grant APVV-0139-06 from the Slovak Research and Development Agency.

P73

Genomic and Expression Analysis of Penicillin Biosynthetic Genes from New Highly Producing Strains of Penicillium chrysogenum

Šmidák R., Královičová M., Jopčík M., Nováková R., Fecková Ľ., Ševčíková B., Kormanec J., Timko J., Turňa J.
Ústav molekularnej biológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava
rsmidak@centrum.sk

All three genes – acvA, ipnA and aatA of penicillin cluster responsible for penicillin biosyn-thesis in Penicillium chrysogenum have been studied in detail using comparative sequence and expression analysis between high-producing and wild type strains. Whole penicillin clus-ter with its flanking regions was cloned as a 45kbp fragment in genomic cosmid library of production strain and shotgun sequenced. Promotor regions of acvA, ipnA and aatA genes and intronic region of aatA gene were amplified via PCR and sequenced also in another produc-tion strain of Penicillium chrysogenum and in two wild type isolates. Several sequence changes in compare to production strain Penicillium chrysogenum AS-P-78 in database were identified within particular regulation regions and more variable flanking regions of penicillin cluster.
A new Real-Time PCR based approach was used to determine copy number of penicillin bio-synthetic genes in analyzed high-producing strains. Two wild type isolates of Penicillium chysogenum were used as reference strains. Single copy genes gdhA and pyrG encoding NADP-dependent glutamate gehydrogenase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase were used as reference genes. Results were confirmed through Southern Blot analysis.
For further expression analysis transcription start points for acvA and ipnA genes from one of the producing strains were localized using primer extension and S1-mapping methods

P74

Frekvence mutací v genech účastnících se metabolismu triglyceridů v kontextu s léčbou hypertriglyceridémie jako rizikového faktoru komplikací aterosklerózy

Kušnierová P., Stejskal D., Ochmanová R.
Oddělení laboratorní medicíny, Středomoravská nemocniční a.s.-o.z. Nemocnice Šternberk
kusnierova.pavlina@seznam.cz

Úvod: V posledních letech byly publikovány informace o neúspěšnosti terapie dyslipoproteinémie v případech výskytu mutací v genech odpovědných za metabolismus triglyceridů.
Cíl práce: ověření výskytu mutací v genu pro LPL, ApoAV, ApoB100, ApoCIII, Apo E u skupiny pacientů s hypertriglyceridémii nereagující adekvátně na hypolipidemickou terapii.
Metodika: vyšetřeno 49 jedinců. Ve vzorcích žilní krve byly stanoveny cholesterol (CHOL), triacylglyceroly (TG), LDL, HDL, Apo A1, Apo B. Byla stanovena přítomnost mutací v genech pro LPL (HindIII, PvuII, N291S), Apo AV (T1131C), Apo B 100, Apo C III (Sst I), Apo E.
Výsledky: nalezena pozitivní korelace mezi LDL a CHOL (c=0,721, p=1,01*10e-6) a mezi TG a HDL (c=-0,692, p=2,67*10e-6). Současně nebyla nalezena souvislost mezi součtem všech mutací sledovaných genů a hladinami TG, LDL či HDL. Všichni jedinci byli přitom léčeni buď monoterapií statiny nebo kombinovanou léčbou statin+fibrát; ani v jednom případě však hodnoty TG neklesly k normálním hodnotám. Uvedené mutace se vyskytovaly ve sledované skupině v následujících frekvencích: ApoAV (T1131C) 13%, ApoE 2/2 ve 21%, 2/3 v 9%, 3/3 ve 47%, 3/4 ve 21% a 4/4 ve 2%, LPL (HindIII) ve 42%, LPL (PvuII) ve 43%, mutace ApoCIII ve 14%. Ve srovnání s běžnou populací byla prevalence těchto poruch významně zvýšená. Nejvyšší hodnoty TG se vyskytovaly u pacientů s mutací LPL(HindIII) a (PvuII).
Závěr: pacienti s hypertriacylglycerolémií rezistentní k terapii mívají nejčastěji mutace genu pro LPL a prevalence mutací genů odpovědných za metabolismus triglyceridů je obecně u těchto osob zvýšena. Je však zajímavé, že prostý součet mutací uvedených genů, odpovědných za metabolismus triglyceridů, nesouvisí přímo s hodnotami triglyceridů, i když každá uvedená mutace má v jejich metabolismu zásadní význam.

P75

KlPDR1 is required for multidrug resistance in kluyveromyces lactis

Balková K., Hodúrová Z., Gbelská Y.
Univerzita komenského v Bratislave, Prirodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie
gbelska@fns.uniba.sk

Multidrug resistance (MDR) is a highly conserved defense mechanism allowing the cells to survive in the presence of toxic compounds. MDR is mainly caused by upregulation of membrane-associated efflux pumps by members of the zinc-cluster transcription factor family. In Saccharomyces cerevisiae the PDR1 and PDR3 genes encode the main transcriptional activators involved in the control of MDR. The Kluyveromyces lactis genome contains only one structural orthologue of S. cerevisiae PDR1/PDR3 genes. The gene encoding the orthologue of ScPDR1 gene was amplified from K. lactis genomic DNA. Overexpression of the KlPDR1 gene from a multicopy plasmid complemented the cycloheximide, oligomycin and fluconazole hypersensitivity of the S. cerevisiae deltapdr1deltapdr3 mutant strain. Disruption of the KlPDR1 gene led to the increased sensitivity of deltalpdr1 mutant cells to several antifungals – fluconazole, itraconazole, clotrimazole, ketoconazole, miconazole and metabolic inhibitors – antimycin A, oligomycin. The drug efflux capacity of cells overexpressing KlPDR1 gene and Klpdr1 mutant cells was measured using rhodamine 6G. A significantly higher rhodamine 6G efflux was observed using the cells of the wild type or cells overexpressing KlPDR1 gene from a multicopy plasmid as compared with the Klpdr1 mutant cells. Accumulation of rhodamine 6G was inversely correlated with the level of efflux in K. lactis mutant cells. The results indicate that the isolated KlPDR1 gene encodes a K. lactis transcriptional regulator that is involved in the control of drug efflux pumps expression and modulation of multidrug resistance in this yeast species.

This work has been supported by grants VEGA 1/0078/08; 1/3246/06

P76
Biochemický důkaz interakce proteinu UBC9 a integrasy viru lidské imunodeficience

Landová M., Knejzlík Z., Ruml T.
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie
Marketa.Landova@vscht.cz

Integrasa viru lidské imunodeficience (HIV-1) katalyzuje integraci retrovirové cDNA do hostitelského genomu, což má za následek stabilní infekci. Integrasa je in vitro schopna sama katalyzovat integrační reakci, in vivo je však tento proces komplexnější a integrasa interaguje s dalšími retrovirovými a buněčnými proteiny. Biologické funkce mnoha proteinů, buněčných i retrovirových, mohou být pozměňovány kovalentní modifikací buněčnými proteinovými modifikátory jako jsou např. ubikvitin a SUMO, které jsou isopeptidovou vazbou kovalentně připojovány na cílové proteiny. V literatuře již bylo popsáno, že HIV-1 integrasa je ubikvitinylována a cíleně degradována ve 26S proteasomu.
Tato práce je zaměřena na studium vztahu mezi integrasou viru HIV-1 a buněčnou SUMOylační dráhou, která zprostředkovává kovalentní modifikaci cílových proteinů proteinovým modifikátorem SUMO. Na základě analýzy primární struktury HIV-1 integrasy jsme nalezli tři potenciální SUMOylační motivy odpovídající konsensuální sekvenci pro kovalentní vazbu SUMO. Všechny tyto tři motivy se nachází ve flexibilních smyčkách na jejím povrchu a mohly by tak být přístupné případné modifikaci. Podařilo se mám prokázat interakci HIV-1 integrasy se SUMOylačním enzymem Ubc9 pomocí kvasinkového dvojhybridního systému a afinitní chromatografie. SUMOylaci HIV-1 integrasy in vitro ani in vivo se nám však prokázat nepodařilo. Případná SUMOylace HIV-1 integrasy, která by mohla záviset např. na její fosforylaci, by mohla být dalším faktorem hrajícím roli v retrovirové infekci.

Tento projekt podporuje GA ČR, grant SCO/06/E001 a Ministerstvo školství ČR, granty 1M6837805002 a MSM 6046137305.

P77
Novel platinum(IV) complex LA-12 induces cell cycle phase specific apoptosis in colon carcinoma cell line HCT116

Blanářová O., Jelínková I., Jendželovský R., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kozubík A.
Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, v.v.i., Brno, CZ; Faculty of Science, Masaryk University, Brno, CZ; Faculty of Science, P.J. Šafárik University, Košice, SK; R&D, Pliva-Lachema, a.s., Brno, CZ
blanarova@ibp.cz

Platinum complexes, cisplatin, oxaliplatin and carboplatin, are frequently used in the therapy of various types of solid tumors. They create DNA adducts and activate DNA damage signaling pathways leading to cell cycle arrest allowing damages to be repaired and/or programmed cell death, apoptosis. Cell cycle specific induction of apoptosis is an important parametr that can shed light on mechanisms and signaling pathways leading to the cell death.
LA-12 is a platinum(IV) derivate containing bulky lipophilic ligand adamantylamine. Its antitumor activity was expressed in tumor cell lines of different origin. LA-12 is able to overcome intrinsic and acquired resistance in ovarian adenocarcinoma cells. Currently, it is undergoing phase I. of clinical testing.
In our experiments, incubation with LA-12 resulted in dose-dependent and cell cycle phase specific apoptosis in colorectal carcinoma cells HCT116. In this cell line, LA-12 was more efficient than oxaliplatin, platinum(II) complex, widely used in therapy of colorectal cancer. LA-12 and oxaliplatin differ in pattern of the cell cycle modulation and it may be linked to the preferable efficacy of LA-12.
This work was supported by grants No. 1QS500040507 IGA ASCR and 301/07/1557 GACR.

P78

Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling

Kamanova J., Kofronova O., Masin J., Genth H., Vojtova J., Linhartova I., Benada O., Just I., Sebo P.
Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic; Institute of Toxicology, Hannover Medical School, Hannover, Germany
kamanova@biomed.cas.cz

Adenylate cyclase toxin (CyaA or ACT) is a key virulence factor of pathogenic Bordetellae. It penetrates phagocytes expressing the beta2 integrin (CD11b/CD18, Mac-1 or CR3) and paralyzes their bactericidal capacities by uncontrolled conversion of ATP into a key signaling molecule, cAMP. Using pull-down activity assays and transfections with mutant Rho family GTPases, we show that cAMP signaling of CyaA causes transient and selective inactivation of RhoA in mouse macrophages in the absence of detectable activation of Rac1, Rac2 or RhoG. This CyaA/cAMP-induced drop of RhoA activity yielded dephosphorylation of the actin filament severing protein cofilin and massive actin cytoskeleton rearrangements, which were paralleled by rapidly manifested macrophage ruffling and a rapid and unexpected loss of macropinocytic fluid phase uptake. As shown here for the first time, CyaA/cAMP signaling further caused a rapid and near-complete block of complement-mediated phagocytosis. Induction of unproductive membrane ruffling, hence, represents a novel sophisticated mechanism of down-modulation of bactericidal activities of macrophages and a new paradigm for action of bacterial toxins that hijack host cell signaling by manipulating cellular cAMP levels.

P79

Molecular studies of the ter operon genes involved in the tellurite resistance present in uropathogenic Escherichia coli

Valkovičová L., Alekhina O., Valková D., Turňa J.
Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University Bratislava, Slovakia
fclenka@yahoo.com

The tellurite resistance of human pathogens is known nearly 100 years. Tellurium is the rare element, present in the environment in a very low concentration. Its soluble salts, mostly potassium tellurite, were due to known toxicity used as the antimicrobial agents in treating numerous human diseases. Many Gram-positive and Gram-negative bacteria developed some level of resistance to potassium tellurite and several of enteric pathogens share the similar locus of ter genes, providing the high level resistance, which is currently in use for isolation and identification of many pathogens, including the emergent haemorrhagic strain Escherichia coli O157:H7. We have studied the clinical isolate Escherichia coli KL53, bearing ter determinant on a large conjugative plasmid pTE53. The presence of ter operon on a large conjugative plasmid represents an important element in the evolution of new pathogens. We have cloned essential genes of tellurite resistance (e. g. terB, terC, terD, terE) from uropathogenic strain Escherichia coli KL53 in the pET28a(+) and Duet Coexpression vectors. Ter proteins have been successfully expressed and their biological function was proved by two plasmid complementation system. This is the initial step for following analyses of tellurite resistance mechanism, in which the potential multiprotein complex of the Ter proteins is involved. The previously real time PCR analysis has confirmed that the terZABCDE genes are represented by a single RNA transcript, forming a single transcriptional unit that is expressed from a single promoter – predicted also by bioinformatics analysis. We functionally determined the existence of such promoter by cloning of the potential promotor sequence prior gene terZ in the fusion with reporter gfpUV gene. However, the terBCDE genes are known to be essential, thus far the mechanism of tellurite resistance still remains unclear.

P80
Molekulárna identifikácia octových baktérií a charakterizácia plazmidu pGP2

Odnogová Z., Grones P., Gičová A., Marhavý P., Grones J.
Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská Republika
odnogova@fns.uniba.sk

Mnohé environmentálne niky sa vyznačujú zvýšenou koncentráciou cytotoxického acetátu. Niektoré druhy baktérií, ako napríklad zástupcovia rodiny gram-negatívnych, aeróbnych baktérií Acetobacteraceae, sú voči nemu rezistentní. Bunky octových baktérií sa vyznačujú tiež prítomnosťou širokého spektra extrachromozómových plazmidových DNA využiteľných na prípravu klonovacích a expresných vektorov, schopných replikácie v bunkách rodu Acetobacter a tiež E. coli. Z fermentačnej zmesi sme izolovali skupinu baktérií octového kvasenia schopných rásť v kyslom prostredí. Na základe fenotypizačnej analýzy a genotypizačnej analýzy 16S-23S ITS oblasi a 23S rDNA sme bunky zaradili do rodu Acetobacter. V bunkách rodu Acetobacter GP2 sme identifikovali malý vysoko kópiový kryptický plazmid pGP2 s veľkosťou 2804 bp s podielom GC párov 51,7%. Analýzou sme určili prítomnosť 10 otvorených čítacích rámcov (ORF) kódujúcich proteíny väčšie ako 50 aminokyselín. Z toho tri ORF kódujú proteín väčší ako 100 aminokyselín. ORF1 kóduje 432 aminokyselín veľký proteín predstavujúci A podjednotku excinukleázy, ORF2 kóduje 213 aminokyselín veľký proteín s funkciou replikačného proteínu a ORF3 kóduje kyslú fosfotransferázu. Pripravili sme sériu delečných derivátov s cieľom potvrdiť funkčnosť ORF2. Plazmid sa replikuje théta mechanizmom. Z plazmidu pGP2 pridaním génu pre rezistenciu na kanamycín sme pripravili shuttle plazmid pGP22, ktorý je schopný replikovať sa v bunkách E. coli ako aj v bunkách A. pasteurianus.

P81
Effect of platinum(IV) complex LA-12 on expression of receptors for trail in human colon carcinoma cells

Jelínková I., Blanářová O., Hofmanová J., Sova P., Kozubík A.
Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, v.v.i., Brno, CZ; Faculty of Science, Masaryk University Brno, CZ; R&D, Pliva-Lachema, a.s., Brno, CZ
ivina@ibp.cz

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) selectively induces apoptosis in a number of tumour cell lines, yet is relatively non-toxic to „normal“ cells. Therefore it is an intensively studied promising candidate for cancer therapy. However, some cancer cells are resistant to TRAIL effects. The elucidation of the TRAIL signalling pathways is hence essential for proper understanding of the mechanisms involved in cell resistance at different levels. Platinum compounds are anticancer drugs used in the therapy of solid tumours. Cytotoxic activity of the drug results from its interactions with DNA. Recently, platinum(IV) drugs have been introduced as an important approach to the treatment of cancer. Novel promising anticancer adamantylamine Pt(IV) complex LA-12 was found to be highly effective in various cancer cells representing different types of tissues and to overcome resistence to conventional platinum drug cisplatin. The aim of this study was to improve the cytotoxic effects of TRAIL by LA-12. Our data showed that pretreatment with LA-12 resulted in increased expression of TRAIL receptors in human colorectal carcinoma cell line HCT116. Subsequent incubation with TRAIL may induce apoptosis in previously TRAIL-resistant cells.

This work was supported by grants No. 1QS500040507 IGA ASCR and 301/07/1557 GACR.

P82

DNA damage in rat peripheral blood lymphocytes after induction of mammary carcinogenesis: effect of melatonin treatment

Kubálková J., Kassayová M., Orendáš P., Ahlers I., Bojková B., Mareková M.
Department of Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Pavol Joseph Šafárik, Tr. SNP 1, 040 66 Košice,
Institute of Biological and Ecological Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Pavol Joseph Šafárik, Tr. SNP 1, 040 01 Košice
janka.kubalkova@upjs.sk

Wide range of chemical compounds can induce DNA strand breaks endogenously as reactive oxygen species. As considered most lethal form double strand breaks can lead to genomic instability and thereafter malignant transformation. Most cells undergo apoptosis. We investigated the anticancer potencial of melatonin in a rat model of N-methyl-N-nitrosourea (NMU) induced mammary carcinogenesis. Effect of melatonin as a free radical scavenger was assessed by single cell gell electrophoresis under alkaline conditions. Modified method allowed to detect DNA damage in strand breaks as well as alkali labile sites. Whole blood lymphocytes from healthy rats were compared to those exposed to NMU inducing mammary carcinogenesis. Moreover, potencial induction of stress from animal immobilization and its effect to health state and development of cancer was observed. Measured parameters relevant to compare the degree of DNA damage in groups with NMU treatment demonstrated no significant evidence in accordance with immobilization. Assessment of significant increase in DNA breaks affected by melatonin predict its efficacy in cancer therapy.

This study was supported by grant application VEGA 1/1286/04 and 1/4233/07 from Slovak grant agency for Science.

Key words: Alkaline comet assay, melatonin, NMU, DNA damage

P83

Expression, purification, and characterization of recombinant DNA helicase from corynephage BFK20

Halgašová N., Grácová A., Timko J., Bukovská G.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovak Republic
Nora.Halgasova@savba.sk

The gene ORF41 coding putative DNA helicase was identified by former bioinformatics analysis on the genome of BFK20 as part of DNA replication gene cluster. We cloned this gene into the expression vector pET28a+, prepared recombinant plasmid pET28/41S, and transformed the expression host Escherichia coli BL21 (DE3). The used cloning strategy should result in synthesis of protein with terminal His-Tag fusion for both easy detection on Western blot and for affinity purification. Putative DNA helicase was expressed as protein gp41HN with fusion sequence on the N-terminus. Optimal conditions for protein expression were found to be as follows: induction with 0.5 mM IPTG and 3 hour cell cultivation at 37 °C. We detected gp41HN in the insoluble fraction of cell lysate and we elaborated a procedure for its isolation from inclusion bodies. We used multiple sonication and washing for purification of inclusion bodies and then specific solubilization with 8.0 M urea followed by final renaturation of isolated protein. We verified the presence of His-Tag fusion on the expressed protein by Western blot analysis. We characterized gp41HN by native electrophoresis and we tested its DNA binding properties using several DNA substrates. This study also provided more comprehensive analysis of helicase conserved motifs in gp41 and assigned this protein into the SF2 helicase family.

Acknowledgement(s): This work was supported by the VEGA Grant 2/0127/08

P84
Molecular Characterization and Biochemical Analysis of Bacteriophage BFK20 Lytic protein

Gerová M., Halgašová N., Ugorčáková J., Bukovská G.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovak Republic
martina.gerova@savba.sk

Corynephage BFK20 is a lytic phage of the industrial L-lysine producing strain Brevibacterium flavum CCM 251. The progeny of most double stranded DNA bacteriophage are released from the cell through the action of two phage-encoded proteins: a holin and an endolysin. Holin, a small hydrophobic transmembrane protein, form nonspecific lesions in the cytoplasmatic membrane to enable the access of the endolysin (a peptidoglycan hydrolase) to the peptidoglycan of the cell wall. According to bioinformatic analysis, the BFK20 endolysin (ORF24) is similar to other autolysins/amidases and belongs to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family. We cloned the predicted bacteriophage BFK20 endolysin gene into the E. coli expression vector pET28a+ with His6Tag fusion on C-terminus. The resulted constructs were sequenced and one deletion (T496) and two insertions (A529, C534) were detected compare to the original sequence of BFK20 genome. The resulted endolysin gene ORF24' which comprise of both ORF24 and ORF25 (825 bp) was cloned into vector pET28a+. The endolysin protein (gp24') was expressed in E. coli cells and detected in insoluble protein fraction of cell lysate. The expression conditions were optimized and endolysin protein was purified using affinity chromatography on Ni2+-charged HisBind column. The purified protein was characterized by native electrophoresis method. HisTag fusion was identified by Western blot. The biological activity of endolysin was detected by well-diffusion assay and zymogram.

Acknowledgement(s): This work was supported by the VEGA Grant 2/0127/08

P85
The lead influence on the individuals of crustaceans in high mountain environment

Júdová J., Šak D.
Výskumný ústav vysokohorskej biológie Žilinskej univerzity, Tatranská Javorina, Slovensko
judova@uniza.sk

Projekt ENVIRONGEN se zabývá využitím toxikogenomiky k objasnění mechanismů negativních účinků expozice člověka cizorodým látkám v životním prostředí (zejména ovzduší). Jako modelová populace byly zvoleny matky a jejich potomci narozeni ve fakultní nemocnici Motol v Praze, u kterých bude studována odpověď organismu na expozici toxickým látkám z hlediska celkové genové exprese a dalších biomarkerů a přenos toxických látek a jejich účinků z matky na plod. V rámci pilotní studie byly odebrány biologické vzorky (žilní krev matky, pupečníková krev a definovaná část placenty) od 79 matek. Změny v genové expresi byly sledovány na úrovni celého genomu za využití mikročipů Human Ref-8 firmy Illumina. Na základě výsledků analýzy genové exprese budou vybrány toxikologicky významné geny, exprese těchto genů bude ověřena metodou RT PCR. K určení biologicky efektivní dávky genotoxických látek byla stanovena hladina DNA aduktů v lymfocytech žilní a pupečníkové krve a placenty metodou 32P – postlabelling, také byla měřena hladina kotininu (metabolit nikotinu) v krvi matek jako marker expozice tabákovému kouři. Zároveň bylo na stanici ČHMÚ (AIM Praha 5) prováděno stacionární měření koncentrace prachových částic (PM2.5) a polycyklických aromatických uhlovodíků. Jako markery oxidačního poškození biologických makromolekul byla prováděna stanovení 8-oxodeoxyguanosinu (nejčastější produkt oxidace bází v DNA), stanovení oxidace karbonylových skupin proteinů a peroxidace lipidů. Cílem studie je kompletní celogenomová analýza a následná identifikace genů, jejichž exprese je vlivem expozice cizorodým látkám a dalších faktorů deregulována. Detekce expresních profilů bude korelována s biomarkery expozice (DNA adukty v lymfocytech, oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů), účinku (chromosomové aberace) a vnímavosti (polymorfismus metabolických a reparačních genů) a s dotazníkovými údaji o zdravotním stavu a životním stylu matky.

Tato studie je podpořena grantem MŠMT ČR č. 2B06088.

P86

Efektívnosť záchytu a vnútrobunková distribúcia fotoaktívnych molekúl (hypericínu) závisí od použitého transportného systému

Bryndzová L., Huntošová V., Mateášik A., Naďová Z., Sureau F., Miškovský P.
Katedra Biofyziky, Prírodovedecká fakulta,UPJŠ, Jesenná 5, 04001 Košice, Slovensko
lenka.bryndzova@yahoo.com

Vnútrobunková lokalizácia fotoaktívnej látky (fts) určuje miesto primárneho poškodenia nádorovej bunky. Prevládajúci typ bunkovej smrti po fotodynamickej akcii, vnútrobunková distribúcia a koncentrácia biologicky aktívnych foriem fts je ovplyvnená spôsobom, akým sa molekuly fts dostávajú do buniek (difúzia vs transport prostredníctvom transportných systémov – napr. prostredníctvom nízkohustotných lipoproteínov (LDL).
Hypericín (Hyp) je prirodzene sa vyskytujúca fotocitlivá látka vhodná pre spustenie apoptotického programu v mnohých bunkových líniách. Kľúčovým predpokladom pre optimálnu odozvu na fotodynamickú akciu je jeho dostatočné množstvo nachádzajúce sa vo vnútri buniek. Metódami fluorescenčnej spektroskopie bola sledovaná miera záchytu Hyp gliómovými bunkami línie U-87 MG. Konfokálna fluorescenčná mikroskopia bola použitá na stanovenie lokalizácie Hyp vo vybraných vnútrobunkových štruktúrach. Sledovali sme stupeň prekrytia fluorescenčných spektier Hyp a fluorescenčných sond špecifických pre jednotlivé bunkové organely. Kolokalizačné experimenty preukázali preferenčne lyzozomálnu lokalizáciu hypericínu v prípade, ak bol do buniek dorpravený prostredníctvom LDL častíc na rozdiel od jeho vyššieho zastúpenia v mitochondriách, ak sa do buniek dostával bez účasti LDL. Fluorescencia Hyp bola sledovaná aj v izolovaných mitochondriách, ktoré predstavujú jeden z vnútrobunkových cieľov.
Rizikom klasických fluorescenčných meraní je intrepretácia výsledkov, ak dochádza k poklesu intenzity fluorescencie študovaných molekúl napriek použitiu vysokých koncentrácií fts. Tento pokles však nemusí byť nevyhnutne spôsobený znížením koncentrácie (napr. vyplavovaním fts z buniek), ale môže byť dôsledkom vzniku nefluoreskujúcich agregátov. Na vyslovenie jasných záverov ohľadom prípadnej tvorby agregátov bolo použité meranie dôb života fluorescencie (FLIM) Hyp, a ukázané, že so zvyšujúcim sa stupňom agregácie doba života fluorescenie Hyp klesala.
Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja grant č. LPP-0337-06 a vzdelávania Prírodovedeckou fakultou UPJŠ projekt č. VVGS-7/2008/F.

P87

Alexa Fluor® Dyes – microarray labeling you can trust

Halbhuber Z., Onderková H.
Central European Biosystems s.r.o.
zbynek.h@cebiosys.com

The key element of microarray analysis is sample preparation and subsequent acquisition of high quality signal from microarray. In case of fluorescently labeled samples, Cy dye is traditionaly the first choice. Our data show that Alexa dyes (Invitrogen) can very sufficiently substitute the Cy dyes in microarray applications.
The amplified, fluorescently labeled samples were hybridized on an appropriate whole genome microarray – rat fibroblasts on Rat29K (Microarrays Inc.) and human mononuclear cells on HumanOneArray (HOA, PhalanxBiotech). Each sample was labeled using AlexaFluor Dye (Invitrogen) and Cy dye (Amersham) during indirect labeling reaction. We monitored a number of parameters such as dye incorporation, background signal, dynamic range or reproducibility. In all cases the Alexa dyes fully substituted Cy dyes and in some important criteria they overcame them (e.g. background intensity).
The AlexaFluor Dyes are perfectly matched for microarrays experiments. Their NHS-esters are easily incorporated into the aminoallyl modified nucleic acid. Due to their photostability and higher signal-to-noise ratio comparing to Cy dyes they can be used as a first choice in microarray labeling. Additionally they are about 25% cheaper, which economical task should also be considered.

P87A
Detection of point mutations in Ras oncogene by Real-Time PCR-based genotyping assay

Ugorčáková J., Bukovská G., Hlavatý T.*, Timko J.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovak Republic, e-mail: Jana.Ugorcakova@savba.sk
**5th Department of Internal Medicine, Comenius University, Bratislava*

Point mutations in *Ras* genes have been found in a large number of human tumors and one of the most useful molecular markers to screen for the presence of cancer are K-*ras* alterations. The point mutations of K-*ras* gene in codons 12, 13, 61 were found in various malignances with high frequency. The highest mutation rate of 75% to 90% is known for pancreatic cancer, in a colorectal carcinoma it is 30-60% and in lung cancer 25-60%. The detection of the early state of the disease is the most promising for depression of fatality. There are a lot of methods for the detection of K-*ras* alterations as the PCRSSCP or PCR-RLFP however there are some problematic issues that should be elucidated, especially regarding poor sensitivity, labor-consumption and difficulty of interpreting the band status.
The aim of our study was to develop the new strategies for analyzing molecular signatures of disease states by application of Real-Time method. In order to detect point mutations in genomic DNA we have used TaqMan SNP genotyping assays for detection of polymorphisms and allelic discrimination. In addition, the detection process was required to discriminate between normal and mutant (minority) DNAs in heterogeneous populations. The discrimination was carried out using allele-specific primers, which flanked single base mutations in codon 12 of K-*ras* oncogene. This method should have high diagnostic value for pancreatic and colorectal cancers prediction.

Acknowledgement: This work was supported by the VEGA Grant 2/7160/27

Přednášky

O27

Analogy insulinu s modifikacemi v poloze B26. Divergence vazebné afinity a biologické aktivity

Žáková L., Kazdová L., Hančlová I., Protivínská E., Šanda M., Buděšínský, M., Jiráček J.
ústav organické chemie a biochemie, v.v.i. Akademie věd České republiky;
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha.
jiracek@uochb.cas.cz

Naše skupina se již několik let zabývá přípravou a biologickou charakterizací analogů insulinu za účelem studia interakce insulinu s receptorem. V této studii jsme připravili několik zkrácených i nezkrácených analogů insulinu s modifikacemi v pozici B26. Zkrácené analogy byly připraveny jako des-tetrapeptid(B27-B30)-insuliny-B26-amidy (DTIA). Porovnali jsme vazebné afinity připravených analogů vůči receptoru insulinu v membránách potkaních adipocytů. V další fázi práce jsme zkoumali schopnost analogů snižovat hladinu krevní glukózy u potkanů in vivo a dále schopnost analogů stimulovat lipogenezi v potkaních tukových buňkách in vitro. Zjistili jsme, že zkrácené analogy [NMeHisB26]-DTIA a [NMeAlaB26]-DTIA se váží na insulinový receptor s velmi vysokou afinitou (214% a 465% v porovnání s lidským insulinem), ale že překvapivě vykazují výrazně nižší biologickou aktivitu než lidský insulin in vivo. Naproti tomu nezkrácené analogy insulinu se stejnými modifikacemi v poloze B26, [NMeHisB26]-insulin a [NMeAlaB26]-insulin, se vázaly na receptor s podstatně nižší afinitou (10% a 21% v porovnání s lidským insulinem) a současně byly i velmi málo účinné in vivo. [HisB26]-insulin vykazoval podobné vlastnosti jako lidský insulin jak ve vazebné afinitě tak v biologické aktivitě in vivo. Schopnost vybraných analogů stimulovat lipogenezi v potkaních adipocytech in vitro dobře korelovala s jejich biologickou aktivitou in vivo. Naše výsledky naznačují, že aminokyseliny B26-B30 a zejména pozice B26 insulinu mají nejednoznačný vliv na interakci s receptorem insulinu a že určité modifikace v poloze B26 DTIA analogů mohou vést k divergenci vazebné afinity a biologické aktivity in vivo. Nabízíme hypotézu, že zkrácené analogy [NMeHisB26]-DTIA a [NMeAlaB26]-DTIA mají rozdílný způsob interakce s receptorem než lidský insulin a že tato rozdílná interakce vede k méně efektivní metabolické odpovědi i přes vysokou vazebnou afinitu obou analogů.

O28

Dipeptidylpeptidasa-IV a příbuzné molekuly: pro- nebo antionkogenní funkce v lidských astrocytárních nádorech?

Šedo A., Bušek P., Stremeňová J., Křepela E.
Laboratoř biologie nádorové buňky, Ústav biochemie a experimentální onkologie,
1.Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze
aleksi@cesnet.cz

Dipeptidylpeptidáze-IV (DPP-IV)-podobná aktivita je nesena většinou členů skupiny multifunkčních “DPP-IV aktivitou a/nebo strukturou homologů” (DASH). Skupina obsahuje DPP-IV,6 - 10 a protein aktivovaných fibroblastů (FAP). Souvislost deregulace expresního vzorce DASH a patogeneze některých nádorů popisuje řada autorů. Četné lokální mediátory, jako substance P (SP) a chemokin “stromal cell derived factor-1alpha” (SDF-1), ovlivňující buněčný růst, jsou substráty DPP-IV aktivity. Tato práce se zabývá charakterizací exprese a funkcí DPP-IV a FAP, DASH molekul buněčného povrchu, v lidských astrocytomech.
Zvýšená exprese DPP-IV v gliomových buňkách in vitro je provázena změnami morfologie, zástavou růstu a sníženou migrací a potlačením signalizace prorůstového mediátoru SP. DPP-IV je asociována s pomalejším růstem i u primárních buněčných kultur odvozených z vysoce maligních gliomů. V lidských astrocytárních tumorech ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání byl však nalezen významný, na stupni malignity závislý, vzestup exprese DPP-IV, FAP a zvýšení DPP-IV aktivity. S expresí a aktivitou DPP-IV těsně korelovala upregulace CXCR4, receptoru SDF-1. Lze spekulovat, že potenciální snížení signalizace SDF-1 v důsledku jeho proteolytické degradace DPP-IV může kompenzovat zvýšená exprese jeho receptoru. Tento mechanismus by facilitoval rozvoj nádorů, obsahujících buněčné populace efektivně kontrolující rovnováhu CXCR4 a DPP-IV. Pro statistické posouzení významu koregulace DPP-IV a CXCR4 pro prognózu pacientů s glioblastoma multiforme byl použit Coxův model proporcionálního rizika.Vysoká transkripce CXCR4 je charakteristická pro prognosticky významně horší skupinu. Následné kroky analýzy svědčí pro podíl DPP-IV na horší prognóze v rámci této skupiny.
Naše výsledky naznačují, že ačkoli na buněčné úrovni může DPP-IV představovat antionkogenní molekulu, v kontextu nádorového mikroprostředí může mít pronádorový potenciál.
Podporováno grantem GAUK 257896 a VZ MSMT 0021620808

O29

Jednokroková afinitní purifikace rekombinantních proteinů založená na samoštěpícím modulu proteinu FrpC bakterie Neisseria meningitidis

Osička R., Sadílková L., Šulc M., Linhartová I., Novák P., Šebo P.
Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague
osicka@biomed.cas.cz

Purification of recombinant proteins is often a challenging process involving several chromatographic steps to be optimized for each target protein. Here we developed a self-excising module allowing single-step affinity chromatography purification of untagged recombinant proteins. It consists of a 250 residue-long self-processing module of Neisseria meningitidis FrpC protein with a C-terminal affinity tag. N-terminus of the module is fused to the C-terminus of a target protein of interest. Upon binding of the fusion protein to an affinity matrix from cell lysate and washing out of contaminating proteins, site-specific cleavage of the Asp-Pro bond linking the target protein to the self-excising module is induced by calcium ions. This results in release of the target protein with only a single aspartic acid residue added at the C-terminus, while the self-excising affinity module remains trapped on the affinity matrix. The system was successfully tested with several target proteins, such as glutathione-S-transferase, maltose-binding protein, beta-galactosidase, chloramphenicol acetyltransferase, or adenylate cyclase and two different affinity tags, chitin-binding domain, or poly-His. Moreover, it was demonstrated that it can be applied as an alternative to two currently existing systems, based on self-splicing intein of Saccharomyces cerevisiae and sortase A of Staphylococcus aureus.

O30

Použití fragmentů proteinových struktur k návrhům peptidových sekvencí selektivně vázajících ionty kovů

Kožíšek M., Svatoš A., Buděšínský M., Muck A., Bauer M., Kotrba P., Ruml T., Havlas Z., Linse S., Rulíšek L.
Gilead Sciences & IOCB Research Centre, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha; Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Charles University, Praha; Mass Spectrometry Research Group, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany ; Department of Biophysical Chemistry, Lund University, Lund, Sweden; Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology; Institute of Chemical Technology, Praha
lubos@uochb.cas.cz

A novel strategy for designing peptides with specific metal-ion chelation sites is presented, which is based on linking the computationally predicted ion-specific combinations of amino acid side chains coordinated at the vertices of the desired coordination polyhedron into a single polypeptide chain. To this aim, a series of computer programs has been written, which (i) creates a structural combinatorial library containing Zi–(X)n–Zj sequences (n = 0–14; Z is the 'via side chain' metal-binding amino acid) from the existing protein structures in the non-redundant Protein Data Bank; (ii) merges these fragments into a single Z1–(X)i1–Z2–(X)i2–Z3–(X)i3–...–Zn polypeptide chain; and (iii) automatically performs two simple molecular mechanics calculations, which makes it possible to estimate the internal strain in the newly designed peptide. The application of this procedure for the most M2+-specific combinations of amino acid side chains (L. Rulíšek, Z. Havlas J. Phys. Chem. B 2003, 107, 2376–2385) yielded several peptide sequences (with a length of 6–20 amino acids) with a potential for specific binding of six metal ions (Co2+, Ni2+, Cu2+, Zn2+, Cd2+, and Hg2+). The gas-phase association constants of the studied metal ions to these de novo designed peptides are here experimentally determined by MALDI ionisation mass spectrometry using 3,4,5-trihydroxyacetophenone as a matrix, whereas the thermodynamic parameters of the metal-ion coordination in the condensed phase were measured by isothermal titration calorimetry (ITC), chelatometry, and NMR methods. The data indicate that some of the computationally predicted peptides are potential M2+-specific metal-ion chelators.

O31
Searching for acridine derivatives with antiaggregating activity

Bellová A.[1], Gažová Z.[2], Imrich J.[1], Kristian P.[1], Tomaščiková J.[1], Bageľová J.[2], Fedunová D.[2], Daxnerová Z.[1], Antalík M.[1, 2]
[1] *Faculty of Science UPJŠ, Košice, Slovakia, ada.bellova@gmail.com*
[2] *Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics SAS, Košice, Slovakia*

The study of protein aggregation saw a renaissance in the last decade, when it was discovered that aggregation is the cause of several human diseases, making this field of research one of the most exciting frontiers in science today. One of the most commonly studied classes of protein aggregation disorders is amyloid disease (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type 2 diabetes) (1). Currently, there are no effective cures for amyloid diseases, but experiments from various cell and animal models suggest that the reduction of amyloid aggregation is beneficial (2).
We have screened a library of structurally distinct acridine derivatives (19 compounds) for their ability to inhibit lysozyme amyloid aggregation in vitro. Thioflavine T fluorescence assay and transmission electron microscopy were used for monitoring the lysozyme fibrillization and inhibiting activity of acridines. We have found that structure of the acridine side chains and molecule planarity influences their antiamyloidogenic activity. The planar acridines inhibited lysozyme aggregation effectively. Spiroacridines and tetrahydroacridines had no significant effect on the prevention of lysozyme fibrillization, probably resulting from the presence of the heterocyclic 5-membered ring and non-planarity of molecule. Moreover, in the presence of some tetrahydroacridines the enhanced extent of aggregation was detected (3).
Acknowledgement
This work was supported by the research grant from the Slovak Grant Agency VEGA No. 7055, 6167, 1/0476/08, 0056 and the VVGS grant PF13/2008/CH.

Reference
1. T. R. Jahn, S. E. Radford., FEBS 272 (2005) 5962-5970
2. I. Khlistunova et al., J Biol Chem 281 (2006) 1205-1214
3. Z. Gazova, A. Bellova et al., Eur Biophys J (2008) (in press)

O32
Priony a prionový protein: vlastnosti a funkce

Holada K.
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha

Priony jsou definovány jako proteinové infekční částice podobné virům, ale postrádající specifickou molekulu kódující nukleové kyseliny. Informace potřebná pro množení prionů v buňkách je nesena tvarem jejich molekuly. Pro sekundární strukturu prionů je charakteristický vysoký podíl struktur skládaného listu. Priony mají tendenci vytvářet fibrilární agregáty, které se mohou v organizmu ukládat ve formě beta-amyloidu. V tom jsou priony podobné řadě dalších proteinů podílejících se na onemocněních spojených s jejich konformační změnou a tvorbou amyloidu. V současnosti je známo více než 20 takových onemocnění, každé je spojené s konformační změnou jiného proteinu. Patří mezi ně například Alzheimerova a Parkinsonova choroba či primární systémová amyloidóza. Priony jsou však jediné amyloid tvořící proteiny, které jsou průkazně infekční. Lidské prionové choroby se dají přenést priony kontaminovanou potravou a nebo v rámci invazivní lékařské péče. Naštěstí je však infekční přenos prionových chorob u člověka velmi vzácný. Zatímco konečná struktura infekční prionové částice a vlastní mechanizmus množení prionů v savčí buňce zůstává nadále nejasný, pravdivost prionové hypotézy byla potvrzena existencí kvasinkových „prionů". Bylo jich nalezeno již 6. Přítomnost prionové formy proteinu v kvasinkách vede k jejímu množení, ztrátě funkce původního proteinu a změně buněčného fenotypu. Infekčnost kvasinkových „prionů" byla prokázána pomocí rekombinantních analogů odpovídajících proteinů „in vitro" složených do formy amyloidu. Oproti tomu pokusy o vytvoření savčích infekčních prionů „in vitro" až do nedávna selhávaly. Změnu přineslo zavedení metody PMCA („protein misfolding cyclic amplification"), pomocí které se podařilo savčí infekční priony připravit. Jednou z velkých neznámých prionového výzkumu zůstává otázka fyziologické funkce normálního buněčného prionového proteinu.
Prezentace bude zaměřena na rekapitulaci současných vědomostí o vlastnostech savčích prionů a mechanizmu jejich propagace a doplněna prezentací výsledků poukazujících na účast buněčného prionového proteinu v procesu tvorby červených krvinek.

O33

A data independent approach for protein identification and simultaneous quantification

Kennedy M., Wildgoose J., McKena T., Hughes Ch., Giles K., Pringel S., Campuzano I., Langbride J., Bateman R. H.
Waters MS Technology Centre, Manchester UK

During the past decade mass spectrometry has become widely accepted as an essential tool to better understand protein function. The technique facilitates both the identification and quantification of proteins in complex samples, typically utilising a data dependent acquisition strategy.
Although, significant performance gains have been made with regard to both instrumentation and identification approaches; the number of peptides that can be simultaneously identified and the confidence of those identifications, remains the most significant limitation of a data dependent approach.
During this presentation a novel approach to protein identification will be described that is NOT limited by the MS/MS switching speed of the system and in addition facilitates the simultaneous acquisition of quantitative information, without the use of isotope labelling.
This presentation will also describe a novel database search algorithm that has been designed for the aforementioned data INdependent acquisition and how it uses well established models of the physical and chemical properties of proteins and peptides to enhance the confidence of identifications.
The data presented demonstrates the ability of this method to correctly identify peptides and proteins from the data INdependent acquisitions and that the approach produces more protein identifications with a significant increase in both the sequence coverage and the number of modified peptides compared to alternative techniques.

Postery

P88
Purifikace nitrilas produkovaných vláknitými houbami Fusarium solani a Penicillium multicolor

Davidová A., Kubáč D., Vejvoda V., Martínková L.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Centrum biokatalýzy a biotransformací, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
alzbeta.davidova@vscht.cz

Vláknité houby Fusarium solani IMI 196840 a Penicillium multicolor CCF 2244 produkující intracelulární nitrilasy byly kultivovány dvěma způsoby – jednokrokově na minerálním mediu podle Czapka-Doxe, nebo dvoukrokově, kdy byla nejprve na bohatém mediu vyprodukována biomasa, u které byla po převedení do chudého media indukována nitrilasová aktivita. Jako induktor byl v obou případech použit 2-kyanopyridin.
Při jednokrokové kultivaci bylo získáno přibližně 400 U/l média v obou případech. Dvoukrokovou kultivací bylo získáno dvakrát, resp. desetkrát více enzymu z P. multicolor, resp. F. solani.
Nativní molekulová hmotnost obou enzymů byla stanovena pomocí gelové filtrace (v obou případech >400 kDa), velikost podjednotky pomocí SDS-PAGE (v obou případech přibližně 40 kDa).
Obě nitrilasy vykazují substrátovou specifitu vůči aromatickým nitrilům; jako referenční substrát byl používán benzonitril. Analýza reakčních směsí byla prováděna vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na monolitické koloně Chromolith Flash.
Financováno projekty IAA500200708 (GA AV ČR), LC06010 (MŠMT) a TANDEM FT-TA5/043 (MPO ČR)

P89
Acridines – effective inhibitors of amyloid aggregation

Gazova Z., Bellova A., Imrich J., Kristian P., Daxnerova Z., Antalik M., Fedunova D., Bagelova J.
Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics SAS, Kosice, Slovakia;Faculty of Science, P. J. Safarik University, Moyzesova 11, 040 01 Kosice, Slovakia ;Faculty of Science, P. J. Safarik University, Moyzesova 11, 040 01 Kosice, Slovakia; Faculty of Science, P. J. Safarik University, Kosice, Slovakia
gazova@saske.sk

A protein amyloid aggregation has been recognized as a hallmark of more than 20 human diseases, including Alzheimer's disease, diabetes type II and aortic medial amyloidosis, which belong to most important pathologies in the developed world today. Amyloid diseases involve the formation of protein amyloid deposits found in the body with a single predominant protein component that is characteristic of each disease [1]. A great number of diverse organic compounds have been found to inhibit or reduce the protein aggregation, but there is still no effective therapy for amyloid disorders [2].
We have investigated an ability of acridine derivatives to inhibit the formation of lysozyme amyloid aggregates, which are the main component of deposits located in the body of individuals affected by hereditary systemic amyloidosis. By a Thioflavine T fluorescence assay and an electron microscopy we have identified several acridines characteristic of planar tricyclic core and aliphatic side chain in the C-9 position and able to prevent and/or destroyed lysozyme fibrillization. The most effective acridines showed a clear dose-dependent activity allowing determination of half-maximal inhibition concentration IC50 and half-maximal depolymerization concentration DC50. The obtained values were in micromolar range. We studied also interaction of acridine derivates with DNA. By a spectrophotometric titration we have determined the acridine binding constants and the number of DNA binding sites.
By these experiments we have identified acridine derivatives with high anti-aggregating and low intercalating activities suggesting their therapeutic potential in the treatment of amyloid diseases.
This work was supported by the VEGA Grant Agency, projects No. 2/7055, 2/0056, 2/6167, 1/0476 and VVGS grant PF13/2008/CH

[1] J. D. Sipe, in Amyloid Proteins, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, Weinheim, Germany, 2005
[2] Pickhardt M., Gazova, Z. et al. (2005) J Biol Chem, 280, 3628

P90

Conformational transitions of cytochrome c in the presence of sorbitol and NaCl

Bágeľová J., Fedunová D., Gažová Z., Fabian M., Antalík M.
Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic;
Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Faculty of Sciences, P. J. Šafárik University, Košice, Slovak Republic;
Department of Biochemistry and Cell Biology, Rice University, Houston, Texas 77005, USA
bagelova@saske.sk

Cytochrome c (cyt c) is one of the most studied proteins with respect to its conformational intermediates. Influence of ionic (NaCl) and non-ionic (sorbitol) additives on structural transitions of cytochrome c was investigated by circular dichroism, optical and EPR spectroscopy.
Using both the pH and temperature perturbation of the solutions of cyt c containing either salt (NaCl) or sugar (sorbitol) the influence of the electrostatic interactions and the steric repulsion between a protein and solutes (crowding effect) were investigated. Generally, both NaCl and sorbitol promote a transition of U ↔ MG state and the stability of the secondary structure is increased relative to the stability of Met80-Fe bond. Transitions in the secondary structure and the axial ligation of heme iron are cooperative but the midpoints do not coincide under all investigated conditions. The largest differences in the stability between the heme pocket and the secondary structures were identified in the temperature-induced perturbations. In contrast the acid-induced transformations of the secondary structure as well as the heme coordination occurred nearly at the same pH values. Antagonistic influence of NaCl and sorbitol on the acid-induced transitions of cyt c was revealed. Sorbitol contributed positively to the stability while the salt destabilizes the native conformation of cytochrome c.
Acknowledgements
The authors thank the Slovak Grant Agency VEGA for support through grants No. 2/6167, 2/7055 and 2/0056.

P91

Soybean protease inhibitors influence growth, development and enzyme activity of proteases of housefly larvae of Musca domestica

Blahovec J., Kostecká Z., Kočišová A.
University of Veterinary Medicine, Košice, Institute of Social Sciences and Health, Prešov, St.Elisabeth University College of Health and Social Sciences,Bratislava, Slovak Republic
blahovec@uvm.sk

Selective inhibition of the larval digestive proteinases can be one of the most important aspects of pest control based on the use of natural bioinsecticides. Many plants including soya contain natural proeinase inhibitors that act by inhibiting protein digestive enzymes in insect larvae or adults, resulting in amino acid deficiencies that can lead to serious developmental delay, mortality, or reduced fecundity. On the other hand a number of polyphagous insects have adapted to the protease inhibitors of their various host plants. Their survival, viability and larval development are not affected by the presence of such molecules in the diet, because of their ability to express specific inhibitor-insensitive digestive proteolytic enzymes.
We have examined the effect of soybean trypsin/chymotrypsin inhibitors on growth and development of housefly larvae, Musca domestica and influence of these inhibitors on enzyme activity of aminopeptidases and trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes in different larval stages.The laboratory tests carried out on larvae of the housefly (Musca domestica) of the susceptible strain SRS/WHO (University Pavia, Italy). Flies were kept in the insectary under standard laboratory conditions. The larvae were reared on a/ standard diet (agar, dried milk and yeast) and b/ standard diet with addition of soybean flour.
The presence of 2% of soybean flour in the diet caused apparent decrease larval length and body mass. The highest differences between control and experimental larvae in length and body mass were found after 72, 96 and 120 hours of development. Housefly larvae fed with soybean inhibitors showed a complete pattern of digestive proteases. Similarly as in normal diet (Blahovec et al., 2006) also in this case we have observed presence mainly aminopeptidases and carboxypeptidases, significantly lower enzyme activity was found for trypsin- and chymotrypsin–like enzymes. However, in contrast with decreased growth and development of larvae, enzyme activity for both exopeptidases and endopeptidases increased in larvae reared on the diet with soybean inhibitors. Ingested soybean had slight effect on aminopeptidases in first stages of larval development. Change in activity was observed in later hours of development when activity apparently increased, after 120 hrs enzyme activity increased approximately two times. Similar pattern have shown trypsin- and chymotrypsin-like enzymes.
From these observations, it seems that growth weight reduction is not result of reduced rates of proteolysis as was reported for many other insects. Instead, the more probable explanation is that feedback mechanism was leading to the higher production of proteinases to compensate for the loss of enzymes bound in inactive enzyme-inhibitory complex. This in turn can lead to the depletion of essential amino acids and finally resulted in decreased growth and retarded development (Jongsma et al., 1995).
Acknowledgement: The authors are thankful to APVT grant agency (Project No. APVT-20-007404).

References
Blahovec J., Kostecka Z., Kocisova A., Vet. Med.- Czech, 2006, 51, 139-144.
Jongsma M.A., Bakker P.L., Peters J., Bosh D., Stiekema W.J., Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 1995, 92, 8041-8045.

P92
Viscometric method as novel approach for detection of thermally induced protein aggregation

Fedunová D., Bánó M., Bágeľová J., Gažová Z., Antalík M.
Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 040 01 Košice, Slovakia;
Department of Biochemistry, PF UPJŠ, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovakia
fedunova@saske.sk

Aggregation of proteins from aqueous solution is a ubiquitous problem in biomedical and biotechnological research. The structures of aggregates can vary from highly ordered fibers to completely amorphous species. Numerous peptides and proteins have been shown to form amyloid fibrils in vitro under appropriate conditions, leading to the suggestion that the ability to form fibrils is an inherent property of polypeptide chains [1]. The experimental limitations shown by some of the amyloid proteins suggest the using of simple models and introduction of new techniques for study the mechanism of amyloid fibrillation. Viscometry seems to by very useful method for this purpose, providing information about conformation and rearrangement of macromolecules in solution. The viscosity of two model systems – lysozyme and poly-L-lysine (PL) was measured by unique Couette-type non-contact rotation viscometer developed in our laboratory [2]. PL undergoes alpha-helix to beta-sheet transition accompanied by amyloid formation depending on experimental conditions. We have observed that temperature induced transitions occurs at pH interval 9.7-11.8 and with increasing chain length is slightly shifted to the lower pH. For each used PL chain we have found narrow pH interval (0.4 in range) in which the thermal transition is fully reversible. These results suggest that polypeptide conformation is sensitive on subtle changes in charge on its side chains. Although theoretical background for quantitative interpretation of viscometric data measured for such complicated objects is not yet developed, they can provide qualitative characteristic about spatial arrangement of proteins into high ordered structures and about the kinetics of aggregation process.

1. MacPhee CE., Dobson CM. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122, 12707-12713
2. Bánó M., Strhársky I., Hrmo I. (1998) Rev. Sci. Instrum. 74, 4788-4793

This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA, projects No. 2/7055, 2/0056, 2/6167.

P93
Vplyv leptínu, grelínu a adiponektínu na metabolický syndrom

Očenášová A., Dobrota D., Galajda P.
Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského v Martine
ocenasova@jfmed.uniba.sk

Úvod: Metabolický syndróm (MS) výrazne zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení a diabetes mellitus 2. typu (DM2). Dôležitú úlohu v jeho etiopatogenéze hrajú adipokíny. Cieľom tejto práce bolo posúdiť vplyv vybraných faktorov MS na hladiny adipokínov leptínu, adiponektínu a hormónu grelínu.
Súbor a metodika:Vyšetrili sme 154 pacientov, z toho 87 mužov. U každého pacienta bola stanovená prítomnosť jednotlivých komponentov MS na základe modifikovaných ATPIII (Adult Treatment Panel III) kritérií. Štatisticky sa analyzovala závislosť sledovaných hormónov od vybraných komponentov MS.
Výsledky: V skúmanom súbore boli vyššie hladiny adiponektínu asociované s neprítomnosťou diabetu a s nižším Body Mass Indexom (BMI). U mužov jeho hodnoty klesali so vzrastom BMI, u žien záviseli od diabetu. Leptín dosahoval vyššie hodnoty u mužov s diabetom. Grelín vykazoval so zvyšujúcim BMI rastúcu tendenciu.
Diskusia: Adiponektín zvyšuje citlivosť na inzulín, ktorého hladiny klesajú v prítomnosti obezity a inzulínovej rezistencie. Závislosť od BMI u mužov by mohla byť podmienená rozdielnou distribúciou telového tuku. Hladiny leptínu u obéznych pacientov v dôsledku leptínovej rezistencie boli zvýšené. Vyššie koncentrácie grelínu , s vyšším BMI by mohli byť zodpovedné za zvýšený príjem potravy u obéznych pacientov.
Záver: Hladiny skúmaných hormónov boli ovplyvnené ústrednými komponentmi MS,
čo môže hrať významnú úlohu v etiopatogenéze MS.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/1189/04.

P94
Příprava, purifikace a charakterizace nativního komplexu CFP-10/ESAT-6

Staněk O., Šimšová M., Šebo P.
Mikrobiologický ústav AV ČR; Proteix s.r.o., Vestec, Česká republika
stanek@biomed.cas.cz

V poslední době opět stoupá počet lidí nakažených tuberkulózou a to nejen v rozvojových zemí třetího světa, ale v důsledku migrace také v zemích vyspělých. Kritickým bodem v boji proti této zákeřné nemoci je včasné a přesné odhalení latentní infekce bakterií Mycobacterium tuberculosis (LTBI). V současné době pro tyto účely nejpoužívanější Tuberkulinový kožní test, založený na stimulaci PPD (Purified Protein Derivative), je však nepřesný díky křížovým reakcím s antigeny environmentálních mykobakteriií a používaní BCG vakcíny. Tento nedostatek se podařilo vyřešit u nových diagnostických testů použitím antigenů CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) a ESAT-6 (6-kDa early secreted antigenic target). Ty jsou kódovány v lokusu RD1 (Region of Diference) přítomném pouze u infekčních kmenů. Připravili jsme expresní vektory pro produkci volných rekombinantních antigenů CFP-10, ESAT-6 a rovněž jejich 1:1 komplexu CFP-10/ESAT-6 v buňkách E. coli. Použitím kmene E.coli ArcticExpress DE3, exprimujícího chaperony Cpn60 a Cpn10 a kultivace za nízké teploty (10°C) se podařilo dosáhnout i produkce rozpustného proteinu ESAT-6 a předejít jeho precipitaci do inkluzních tělísek. Komplex CFP-10/ESAT-6 byl stabilizován již ko-produkcí antigenu CFP-10, který plnil funkci chaperonu ESAT-6. Při izolaci antigenů z biomasy bylo využito zahřátí cytoplazmatické frakce na 70 °C po dobu deseti minut s následnou precipitací denaturovaných balastních proteinů. Tvorba komplexu CFP-10/ESAT-6 izolovaného přímo z buněk, nebo připraveného smícháním byla ověřena pomocí nativní elektroforézy BN-PAGE a interakce protein-protein byly charakterizovány pomocí CD spektroskopie a rezonance povrchových plazmonů.

P95
Secretion of extracellular proteases from filamentous fungi: nutrition vs. recognition

Šimkovič M., Kurucová A., Varečka Ľ.
Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovak Republic
martin.simkovic@stuba.sk

Filamentous fungi are versatile microorganisms that exhibit different properties depending on their external environment. In order to utilize the variability of complex substrates, filamentous fungi are able to secrete wide spectrum of hydrolytic enzymes capable of degrading complex substrates. Cellulolytic enzyme systems produced by the different strains of Trichoderma spp. are the best examples of versatility and adaptability for the saprophytic strategy of surviving. Filamentous fungi are known to secrete serine-, aspartic- and metallo- proteases upon cultivation. In this study we aimed to answer the question whether the protease secretion in filamentous fungi is dependent on the type of protein used as substrate. We found that the protease secretion by Trichoderma viride is induced in the presence of yeast extract, or of purified proteins, such as bovine serum albumin, casein, or ovalbumin. We found furthermore that properties of proteases induced under cultivation conditions were different in various aspects (temperature- and pH-dependencies, substrate specificity, sensitivity to protease inhibitors, chromatographic properties). Protease activities were characterized by electrophoresis in polyacrylamide gel with co-polymerized gelatine. Multiple proteases bands with high-molecular weights (higher than 70 kDa) were detected by gelatine zymography. Patterns of protease bands were inducer-specific. Expression profile of genes encoding known proteases from Trichoderma genus was analyzed.
These results show that the induction of extracellular proteases in Trichoderma viride fungus is not purely nutritive process but it also includes an unknown molecular recognition process, which triggers a specific secretory response.
This work was supported by the Slovak Grant Agency for Science (VEGA, projects Nr. 1/0434/08 and 1/3251/06) and by the Science and Technology Assistance Agency under the contract Nr. APVT-20-003904.

P96

Izolace a charakterizace nukleasy z pylu borovice černé, stanovení jejího protinádorového účinku in vitro

Bílahorková A., Orctová L., Matoušek J., Lipovová P., Králová B.
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha; Ústav molekulární biochemie rostlin, AV ČR České Budějovice
bilahora@vscht.cz

Jednou z možností léčby rakovinných onemocnění je použití cytotoxických nukleas. Je znám protinádorový účinek živočišných nukleas, jako například onkonasy, která je v současné době ve III. fázi klinického testování. Dosud byly testovány především živočišné nukleasy, nicméně v posledních letech se zaměřuje pozornost na nukleasy rostlinné nejen kvůli snadnější dostupnosti, ale také kvůli nižší pravděpodobnosti ovlivnění savčím cytosolickým inhibitorem. Jednou z možností je využití nukleasy z pylu borovice černé. Enzym byl izolován z pylových zrn extrakcí do vodného roztoku sacharosy, extrakt byl zahuštěn pomocí ultrafiltrace 20x a dále byl purifikován pomocí ionexové, afinitní a gelové permeační chromatografie. Takto byla připravena homogenní nukleasa, která byla následně charakterizována. Bylo prokázáno, že štěpí jak jednořetězcové, tak i dvouřetězcové molekuly DNA a RNA a také že degraduje cirkulární plasmidovou DNA Cytotoxicita pylové nukleasy byla in vitro sledována na suspenzní nádorové linii ML-2 (akutní myeloidní leukemie) pomocí tetrazoliové metody.

Tato práce vznikla za podpory MSM6046137305 a GAČR 521/06/1149.

P97

Vliv malonyl-3'-defosfo-CoA na kinetiku in vitro enzymových reakcí katalyzovaných chmelovými chalkonsyntázovými homology chs_H1, chs2, chs4 a vps

Škopek J., Matoušek J.
Biologické centrum AV ČR/Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice
skopekj@umbr.cas.cz

Chalkonsyntázy a další podskupiny enzymů polyketidových syntáz typu III se podílejí na syntéze metabolitů s rozmanitými funkcemi včetně látek s antimikrobiálními účinky, antokyanových květních barviv, UV fotoprotektantů atd. Přestože základní reakční mechanismus všech těchto enzymů je identický - stupňovité připojování acetátových jednotek odvozených z malonyl-CoA k nascentnímu meziproduktu, jednotlivé enzymy se liší ve „startovacím" substrátu, v počtu polyketidových elongací a v mechanismu finální cyklizační/aromatizační reakce (pro přehled např. Austin and Noel, 2003).
Hinderer and Seitz (1986) demonstrovali in vitro inhibiční účinky malonyl-3'-defosfo-CoA na chalkonsyntázu z mrkve. U ostatních zástupců polyketidových syntáz typu III i přes zřetelné rozdíly některých aminokyselinových postranních řetězců v pozicích souvisejících s vazbou -CoA skupiny (Austin and Noel, 2003), nebyl tento jev dosud zkoumán. V současné době provádíme testy vlivu malonyl-3'-defosfo-CoA na kinetiku in vitro enzymových reakcí katalyzovaných chmelovými chalkonsyntázovými homology chs_H1 (AJ304877), chs2 (AB061020), chs4 (AJ430353) a vps (AB015430). Tyto enzymy jsme zvolili proto, že reprezentují polyketidové syntázy typu III z jednoho druhu rostliny, z předešlých experimentů známe jejich distribuci v rámci vybraných orgánů a pletiv v rostlině (zatím nepublikováno) a proto, že jsou mezi nimi nápadné rozdíly v některých aminokyselinových postranních řetězcích, podílejících se na vazbě -CoA skupiny.

Tento projekt je hrazen grantem GAČR 521/06/P323.
Literatura
Austin, M. B. and Noel, J. P. Nat. Prod. Rep. 20: 79-110, 2003.
Hinderer, W. and Seitz, H. U. Arch. Biochem. Biophys. 246 (1): 217-224, 1986.

P97A

Oostatic peptides containing D-amino acids: Activity and degradation in the flesh fly *Neobellieria bullata*

Hlaváček J., Bennettová B., Slaninová J., Černý B., Vlasáková V., Holík D., Tykva R.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, v.v.i., Prague 6, Czech Republic; Institute of Entomology, CAS, v.v.i., České Budějovice, Czech Republic; 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague 2, Czech Republic; Institute of Experimental Botany, CAS, v.v.i., Prague 4, Czech Republic

Deteriorating effect of C-terminus truncated 4P and 5P analogs [1,2] of decapeptide H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro_6-OH [3] on ovarian development of insect species Diptera, Orthoptera and Hemiptera has stimulated analysis of metabolic degradation of corresponding peptides. Radiolabeling in different positions of the peptide chain allowed determination of the degradation decisive steps - the fast splitting off the C-terminal Pro from the 5P followed by successive cleavage of Tyr and Asp from the N-terminus in accordance with high biological activity of both the peptides. Even if 5P is degraded quite quickly, the biologically active tetrapeptide is formed, that is degraded much slower [4]. After introduction of corresponding D-amino acids into peptide chain of 5P, the same or even stronger oostatic effect in comparison with parent peptide was observed. In the degradation assay, an elimination of enzymatic cleavage of peptide bonds pointing from the labeled central Pro residue to either D-Ala or D-Asp residues in the neighborhood was detected. We conclude, that high oostatic effect of D-analogs could reflect an apparent loss of enzymes ability to recognize and cleave the corresponding bonds in 5P. The interaction of D-isoforms by incidental receptors is worsened and therefore the different mechanisms of action for these flexible oostatic peptides in the insect might be suggested.
Supported by the Czech Science Foundation No. 203/06/1272 and the Research Project No. Z40550506

References

[1] J. Hlaváček, B. Bennettová, T. Barth, R. Tykva: J. Peptide Res. (1997) 50, 153-158.
[2] J. Hlaváček, R. Tykva, B. Bennettová, T. Barth: Bioorg. Chem., (1998) 26, 131-140.
[3] D. Borovsky, Carlson D.A., Griffin P.R., Shabanovicz J., Hunt D.F.: FASEB J. (1990) 4, 3015-3020.
[4] R. Tykva, J. Hlaváček, V. Vlasáková, B. Černý, L. Borovičková, B. Bennettová, J. Holík, J. Slaninová: J. Chrom. B, (2007) 848, 258-263.

Přednášky

O34
Heterogenita mutací proteinu p53 a jejich význam v terapii nádorových onemocnění

Hrstka R., Müller P., Vojtěšek B.
Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
hrstka@mou.cz

Somatické mutace genu TP53 se vyskytují u přibližně poloviny všech lidských nádorů. Mimo to jsou rovněž známy případy, kdy je v nádorech exprimován wild-type p53, avšak p53 signální dráha je přesto nepřímo inaktivována. Samotná mutace genu TP53 obvykle vede k i) inaktivaci DNA vazebných schopností, nebo ii) změnám konformace, případně iii) kompletní ztrátě funkce proteinu.
Ztráta antionkogenních vlastností wild-type p53 proteinu je obvykle spojena s bodovými mutacemi TP53 genu, čímž současně dochází ke kumulaci mutovaného proteinu, který v řadě případů získává nové onkogenní vlastnosti (tzv. „gain of function"), jenž aktivně přispívají k neoplastické transformaci. Jedním z hlavních cílů onkologického výzkumu je popsat molekulární mechanismy zodpovědné za „gain of function" mutovaného p53. Je známo, že wild-type p53 je schopen přímo regulovat expresi až několika tisíc genů. Strukturní analýzy proteinu 53 rovněž potvrdily, že DNA vazebná doména p53 je vysoce flexibilní, což vysvětluje vysokou koncentraci mutací umístěných právě do této oblasti. Rozdíl v konformacích mezi wild-type a mutovaným proteinem p53, stejně jako heterogenní charakter samotných mutací, tak může být příčinou celé škály různých strukturně-funkčních variant proteinu p53. Naše výsledky ukazují, že u některých typů mutací TP53 dochází k tvorbě komplexu mutovaného proteinu 53 spolu s proteiny MDM2 a Hsp90, v důsledku čehož dochází ke stabilizaci mutovaného p53 a následné transaktivaci některých cílových genů. V těchto případech se nabízí terapie nádorových onemocnění založená na inhibici interakcí mezi mutovaným p53, MDM2 a Hsp90 např. pomocí 17AAG (specificky inhibuje Hsp90) nebo nutlinu (specificky inhibuje interakce p53-MDM2). Destabilizací tohoto komplexu pak dochází k zásadní inhibici transkripční aktivity mutovaného proteinu p53 a naopak se v nádorových buňkách iniciuje jeho rychlá degradace.
Tato práce je podporována GA ČR 301/08/1468.

O35
Mnohonásobné účinky izotiokyanátov v nádorových bunkách

Sedlak J., Jakubikova J., Bodo J., Duraj J., Bao Y.
Cancer Research Institute SAS, Vlarska 7, 833 91 Bratislava, Slovakia; University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK
exonsedl@savba.sk

Forty years ago the cytostatic and cancerostatic activity of some naturally occurring ITC and their synthetic analogues was observed.
The molecular mechanisms of ITC action are complex mainly due to their reactivity and low molecular weight. Reduced glutathione is the main cellular target in reaction that produces the conjugate that is substrate for MRP transporter. The activation of MAPK, production of ROS, cell cycle modulation, histone phoshorylation, and apoptosis induction represent some of effects observed in different model systems. It was shown, that promotion of cell death by ITC is not precluded by MDR phenotype, p53 mutation, and mismatch repair deficiency. Moreover, the use of ITC in combination with standard chemotherapeutic drugs such as doxorubicin and cisplatin exerts synergistic effect. Recently, ITC were found to affect the epigenome, under certain experimental conditions. Abnormal DNA methylation causes aberrant gene expression and genomic instability that is major cause of genetic damage leading to cancer. Several ITC were discovered to attenuate HDAC activity and treatment of prostate cancer cells led to the demethylation and re-expression of silenced GSTP1 gene. Mechanism of this effect is not known, because others pharmacological HDAC inhibitors did not affect GSTP1 methylation.
The approach to administer chemotherapy with lower doses of drugs on a frequent or continuous schedule is referred to as metronomic chemotherapy. The metronomic therapy is effective when combination of cytostatic and antiangiogenic drugs is applied. The effect of ITC on essential steps of neovascularization, basement membrane integrity, endothelial cell proliferation was described. We can speculate that observed potentiation of cisplatin or daunomycin toxicity by coadministration of ITC is due to antiangiogenic effect of ITC.
This work was supported partially by the Slovak R&D Agency under the contract No. 51-017505, VEGA grants 2/7059/27 and 2/0119/08.

O36
Úloha genů ABC transportérů v rezistenci nádorů prsu

Vaclavikova R., Nordgard S., Alnaes G. A., Hubackova M., Hlavata I., Kubackova K., Kodet R., Mrhalova M., Pecha V., Kristensen V.N., Gut I., Soucek P.
National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; Department of Genetics, Institute for Cancer Research, Oslo, Norway; Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; Department of Oncosurgery, Diagnostic and Therapeutic Center Prague, Czech Republic
rvaclavikova@szu.cz

The role of ABC transporter genes in breast cancer resistance

Multidrug resistance (MDR) remains one of the primary causes of suboptimal outcomes in cancer therapy. ATP-binding cassette (ABC) transporters belong to a family of transporter proteins that contribute to drug resistance via ATP-dependent drug efflux pumps. The aim of this study was to assess the role and clinical impact of ABC transporter-related genetic factors in development of MDR. Expression profile of ABC transporter genes (MDR1,MRP1/2,BCRP) was evaluated in 90 breast cancer patients. Gene expression was quantified in samples from tumor and non-tumor breast tissues by real-time PCR. In addition, seven MDR1 polymorphisms (SNPs) were analyzed using Nanogen electronic microarrays. Analysis of associations between 1/ expression of ABC transporters, 2/ genetic variability and 3/ haplotype pattern of MDR1 on one side and clinico-pathological features including survival of patients on the other side was performed. ABC transporters were expressed in majority of cases. Striking inter-individual variability in their expression was found. MDR1 was down-regulated in 79.5% of all tumors, while opposite was observed for MRP1/2 expression. Similar expression profiles were found in patients treated by neoadjuvant and adjuvant chemotherapy. High frequencies of variant alleles in MDR1 exon12 (C1236T, qT=38.3), exon21 (G2677T/A, qT=40.0) and exon26 (C3435T, qT=54.0) were observed. Individuals with variant alleles in exons12 and 26 had significantly lower MDR1 expression in their tumors than patients with normal genotype. These two SNPs also correlated with estrogen receptor status of patients (P=0.011 and P=0.051 respectively). MDR1 expression seemed to be a potential predictive factor of disease-free survival (P=0.031) in patients treated with anthracycline or taxane containing regimens. This work was supported by grants IGA 9426-3 a GACR 305/07/P347.

O37
Antioxidační ochrana nádorových buněk a možnosti jejího cíleného ovlivňování

Lipšová A., Vachtenheim J., Borovanský J.
Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze, Laboratoř molekulární biologie kliniky plicní hrudní chirurgie, 3. LF UK v Praze
a.lipsova@seznam.cz

Nádorové buňky produkují velké množství radikálů a ROS, zejména H2O2. Peroxid vodíku se podílí na maligní transformaci buňky (cestou poškození DNA, mutace, navození buněčné proliferace, resistence k apoptose, zvýšené angiogenese, invase a metastasování), kdežto zvýšená exprese enzymů detoxikujících H2O2 může působit v opačném směru. Nárůst buněčné koncentrace H2O2 je však i účinnou zbraní likvidace nádorových buněk, čehož využívá řada chemotherapeutik (např. paclitaxel, cis platina, etoposid, doxorubicin) i antiproliferativně působící fenolické fytolátky. Buňky maligního melanomu díky melanogenesi jsou známí producenti H2O2 . Proto jsme porovnali enzymovou antioxidační ochranu a celkový antioxidační stav (TAS) u 7 lidských melanomových linií (Hbl, Beu, RPMI 7951, Malme SM, SK-Mel5, LND-1 a 501mel) s analogickými parametry 5 lidských nemelanomových linií – osteosarkom U2-OS, plicní karcinom H1299, neuroblastom SK-N-SH, glioblastom T98G a SW480 colorektální karcinom. TAS byl stanovován TAS kitem Randox Lab, aktivity antioxidačních enzymů fotometricky – katalasa /kit Sigma/, glutathionperoxidasa (GPX) /Ransel kit/, superoxid dismutasa (SOD) /Ransod kit/, γ-glutamyltransferasa (GGT) GGT100 kitem (Pliva&Lachema). Katalasa jevila nejvyšší aktivitu ze studovaných enzymů se signifikantně vyšší aktivitou v melanomových buňkách oproti zbylým liniím (p=0.004). Aktivity ostatních enzymů byly výrazně nižší – SOD v řádu nkat/106 buněk, GPX a GGT v řádu pkat/106 buněk. TAS byl signifikantně vyšší u všech melanomových linií oproti nemelanomovým (p=0.004). Spearman Rank Order Correlation program (Statistica 7) odhalil korelaci mezi katalasovou aktivitou a TAS (R=0,909, p level = 0,00004), což svědčí o její klíčové úloze v antioxidační ochraně. Ochrana melanomových buněk byla významně vyšší než ostatních nádorových buněk. Ovlivnění katalasové aktivity (pomocí inhibice či siRNA technologie) je novým směrem v experimální therapii melanomů.
Podporováno z VZ 21608808 a IGA VZ CR NR9319-3.

O38
Možnosti využitia 1H a 31P magnetickej rezonančnej spektroskopie pri štúdiu a diagnostike nádorových ochorení mozgu

Dobrota D., Bittšanský M., Sivák Š., Jankovič P., Poláček H.
Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lek. fakulta, Univerzita Komenského; Rádiodiag. klinika, Martinská fakultná nemocnica; Neurologická klinika, Martinská fakult. nem., Martin, Slovensko
dobrota@jfmed.uniba.sk

ÚVOD: Magnetická rezonančná spektroskopia (MRS) nám umožňuje sledovať biochemické zmeny a metabolické dráhy in vitro a in vivo pre metabolity obsahujúce atómy s magnetickými vlastnosťami (1H, 31P, 13C, 19F a iné). Protónová magnetická rezonančná spektroskopia (1H MRS) dokáže lokalizovane merať signály mozgových metabolitov s nízkou molekulovou hmotnosťou ako N-acetyl aspartát (NAA), metabolity obsahujúce cholín (Cho), kreatín a fosfokreatín (Cre), laktát (Lac) and niektoré ďalšie. Pomocou fosforovej magnetickej rezonančnej spektroskopie (31P MRS) je možné lokalizovať signály látok podieľajúcich sa najmä na energetickom metabolizme bunky a tiež je možné merať vnútrobunkové pH.
METODIKA: Pomocou 1H MRS spektroskopie in vivo sme sledovali signály metabolitov niektorých typov mozgových nádorov. Spektrá boli získané v rozličných častiach mozgu pomocou klinického skenera Siemens Symphony (1,5 T) a štandardných meracích protokolov.
VÝSLEDKY A ZÁVERY: 1H MRS poskytuje hodnotné informácie o zmenených signáloch metabolitov a ich pomerov, charakteristických pre rôzne druhy nádorov. Najväčšou výhodou MRS pri in vivo meraní je možnosť sledovať tieto biochemické zmeny v reálnom čase bez akéhokoľvek zásahu do tkaniva. Biochemické zmeny je možné registrovať pred objavením sa morfologických zmien.
In vivo vyšetrenie 1H MRS nám poskytuje cennú informáciu o biochemických rozdieloch rôznych typov nádorov ľudského mozgu. Jednoduché spektroskopické meranie je možné začleniť do štandardného diagnostického protokolu.
Táto práca bola podporená grantom Ministerstva školstva SR aAV/ 1105/2004 a, MVTS a EÚ grantom COST B21.

O39A
Současnost a budoucnost nádorových markerů

Springer D., Zima T.
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1.LF UK Praha
springer@vfn.cz

Nádorovým markerem rozumíme látku přítomnou v nádoru nebo jím produkovanou v souvislosti s výskytem nádorového onemocnění. Látku je možné stanovit kvalitativně nebo kvantitativně chemickými, imunologickými nebo molekulárně biologickými metodami. Mezi markery produkované tumorem patří enzymy (neuron-specifická enoláza NSE, prostatický specifický antigen – PSA, thymidinkinasa – TK), onkofetální antigeny (AFP, CEA), imunoglobuliny nebo jejich fragmenty či podjednotky (monoklonální imunoglobuliny, tzv. "paraproteiny"), hormony (hCG, PTH, kalcitonin, gastrin, prolaktin, norepinefrin), fragmenty komplexních glykoproteinů, (CA19-9, CA 15-3, CA 125), fragmenty cytokeratinů (TPA, TPS, CYFRA21-1), molekuly receptorové povahy (estrogenový a progesteronový receptor, receptor pro interleukin 2, HER2/neu a EGF) a cirkulující buněčné elementy. Mimo obvyklé aplikace klasických nádorových markerů jsou klinicky užitečné i některé genetické abnormality a to především pro specifikaci abnormality nádorových buněk určující způsob léčby. Jde jednak o přímou detekci mutací v DNA, proteinové produkty onkogenů (např. c-myc, c-fos, k-ras, src), změny v jejich posttranslačních modifikacích v maligní tkáni nebo o genetické změny v maligní buňce nebo detekci mutací v tumor supresorových genech (BRCA1, BRCA2, p53).
Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění neexistuje univerzální nádorový marker, ani ideální marker s vysokou senzitivitou i specificitou pro určitý typ nádoru. Nezvýšená koncentrace nádorového markeru není důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění, naopak pozitivní výsledek nemusí znamenat přítomnost zhoubného nádoru.
Sledování průběhu choroby je hlavní indikací stanovení nádorových markerů, vzestup jejich hladiny upozorní na návrat choroby před klinickou diagnózou. K vyšetření koncentrace nádorových markerů jsou obvykle používány metody imunoanalýzy. Potřeba dlouhodobého sledování pacienta vyžaduje neměnící se technologii stanovení pro daný marker.

O39B

Predikce účinnosti protinádorové léčby v onkologii – Správná léčba správnému pacientovi ve správném čase

Hajdúch M.
1Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc
hajduchm@gmail.com

Klinická onkologie čelí v posledních několika letech stoupajícímu počtu výsledků plynoucích z molekulárního výzkumu biochemie maligních onemocnění, jejichž implementace vede ke specifičtější léčbě nádorů. Vůbec nejčastěji jsou nová protinádorová léčiva směrována do rodiny HER (ERBB). Jedním z nejvíce sledovaných protoonkogenů je gen HER2, jehož amplifikace vede k nadprodukci receptoru, což se dává do souvislosti se vznikem různých typů nádorů u člověka (například karcinomy prsu, ovária, gastrointestinálního traktu). Patogenetická souvislost mezi nádorovou proliferací a amplifikací HER2 dala podnět k přípravě blokující humanizované protilátky proti extracelulární doméně genu HER2, toto léčivo bylo později vyvinuto a registrováno pro léčbu karcinomu prsu pod názvem trastuzumab.
Obdobně je i gen HER1 (EGFR1) vhodný k cílenému léčebnému ovlivnění. Ke zvýšené aktivaci proteinu EGFR1 v nádorech dochází jeho overexpresí, amplifikací, delecí extracelulární domény, nebo aktivujícími mutacemi v tyrozinkinázové doméně receptoru. Proti neřízené aktivaci proteinu EGFR1 je zaměřena cílená terapie nízkomolekulárními i vysokomolekulárními inhibitory EGFR1, které po navázání na protein inhibují fosforylaci tyrozinkinázové části receptoru (nízkomolekulární inhibitory – gefitinib a erlotinib) nebo brání interakci s ligandou na extracelulární části receptoru (vysokomolekulární inhibitory, např. cetuximab a panitumab) a následně tak blokují aktivaci následných signálních drah. Naopak aktivační mutace onkogenu KRAS, který je lokalizovaný pod EGFR1 receptorem, je signálem pro rezistenci na terapii EGFR1 inhibitory.
Terapie cílenými protinádorovými léčivy je nákladná a účinná převážně u pacientů s jednoznačnou patologickou aktivací příslušného genu, což vede ke zvýšeným požadavkům na přesné vyšetření prognosticko-prediktivních parametrů, jejíž význam bude v přednášce podrobně diskutován.
Poděkování: Práce na projektu byla podporována granty MSM6198959216 a LC07017.

O40

Klinický význam exprese CEA, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 u pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu

Pešta M., Topolčan O., Sutnar A., Liška V., Třeška V., Holubec L., Černý R.
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni a FN Plzeň
martin.pesta@lfp.cuni.cz

Játra jsou nejčastějším místem metastazování kolorektálního karcinomu. Pacienti s opakovanými resekcemi jaterních metastáz kolorektálního karcinomu (MKK) po rekurenci onemocnění dosahují podobného celkového přežití, jako pacienti s jednou resekcí. Proto by bylo prospěšné získat relevantní markery pro časnou diagnózu rekurence. Na základě předchozích studií bylo zvoleno stanovení exprese mRNA CEA, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 ve tkáňových vzorcích jaterních metastáz a zároveň stanovení předoperačních hladin odpovídajících proteinů v séru s cílem zjistit vztah všech těchto hodnot k délce bezpříznakového období (DFI).
Vzorky tkání od 40 operovaných pacientů byly použity pro kvantifikaci mRNA metodou real-time RT-PCR. Stanovení předoperačních hladin ekvivalentních proteinů v séru bylo provedeno imunoanalyticky, a to CEA metodou IRMA, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 metodou ELISA. Zvýšená hladina exprese mRNA CEA, MMP-9 a TIMP-1 u pacientů s MKK byla asociována s kratším DFI ($p<0,0225$, $p<0,0282$, $p<0,0175$). Také zvýšené předoperační hladiny CEA a TIMP-1 v séru pacientů s MKK jsou signifikantně asociovány s kratším DFI ($p<0,0006$, $p<0,0044$). Nenalezli jsme signifikantní vztah mezi expresí mRNA MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 a CEA a předoperačními hladinami proteinů.
Výsledky umožňují identifikaci pacientů s vyšší pravděpodobností rekurence onemocnění a mohou pomoci v chirurgickém a onkologickém přístupu k pacientům po resekci jaterních metastáz kolorektálního karcinomu.
Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620819.

Postery

P98

Malfunction of apoptosome pathway in non-small cell lung cancer cells

Moravčíková E., Křepela E., Procházka J., Čermák J., Benková K.
Laboratories of Molecular and Cell Biology and Division of Surgery, Department of Pneumology and Thoracic Surgery, University Hospital Bulovka, Prague; Department of Pathology, University Hospital Bulovka, Prague
moravcikerika@yahoo.com

The apoptosome pathway is a cell death inducing mechanism which is set into motion during a variety of cellular stresses that are associated with escape of mitochondrial cytochrome-c into the cytoplasm. In order to get some insight into the functional status of this pathway in lung cancer cells we investigated its activatability in the cytosol from non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and from NSCLC tissues and matched lungs from surgically treated patients. Furthermore, we examined the transcriptional expression status of an Apaf-1 nuclear translocator nucling (Nuc; UACA) in the NSCLC tissues and lungs. The induction of active apoptosome formation in cytosols was accomplished by addition of cytochrome-c and dATP and the generated caspase-3 activity was measured with a fluorogenic tetrapeptide substrate. The expression of Nuc mRNA was quantitated by real time
RT-PCR. The results are as follows. The analysis of apoptosome activatability showed that cytosols from some NSCLC cell lines (e.g. CALU-1) and tissues are highly prone to apoptosome activation whereas cytosols from other NSCLC cell lines (e.g. A549) or tissues are completely resistant. The expression of Nuc mRNA in NSCLC tissues and its histological subtypes was significantly lower in comparison with matched lung parenchyma. In fact, in 64 (71%) of 90 examined NSCLC patients the tumors had more than twofold lower expression of Nuc mRNA as compared with matched lungs. Taken together, the present work suggests that there might be combined malfunctions in the apoptosome pathway in a subset of NSCLCs, including the failure of apoptosome assembly/activity and downregulation of nucling expression. This work was supported by an institutional research project (No. MZO 00064211) from Ministry of Health, Czech Republic.

P99

Expression of DNA fragmentation factor subunits in lung cancer cells and tissues

Žbodáková O., Křepela E., Procházka J., Čermák J., Benková K.
Laboratories of Molecular and Cell Biology and Division of Surgery, Department of Pneumology and Thoracic Surgery, University Hospital Bulovka, Prague; Department of Pathology, University Hospital Bulovka, Prague
olga.zbodakova@yahoo.com

Fragmentation of nuclear DNA is a typical hallmark of apoptosis. The major mode of DNA cleavage during apoptosis is the oligonucleosomal fragmentation which is performed by activated DNA fragmentation factor (DFF). In its latent form, DFF is a complex of two protein subunits, the endonuclease DFFB and its inhibitor/chaperone DFFA. In this work, we investigated the expression status of both DFF subunits in non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC) cell lines and in NSCLC tissues and lung parenchyma from surgically treated patients. The expression of both DFF subunits was analyzed on the level of mRNA (using real time RT-PCR) and protein (using SDS-PAGE/ immunobloting). The results are as follows. DFFA and DFFB mRNAs and proteins were expressed in NSCLC cells and tissues and lungs. The expression of DFFA mRNA was significantly higher in NSCLC cell lines and tissues, including squamous cell lung carcinomas (SQCLCs) and lung adenocarcinomas (LACs), as compared with lungs. In fact, in 28 (31%) of 90 examined NSCLC patients the tumors had more than twofold higher expression of DFFA mRNA as compared with matched lungs. The expression of DFFB mRNA in NSCLC cell lines or tissues and in lungs was not significantly different. Unlike the comparable levels of DFFA mRNA expression in SQCLC and LAC tissues the expression of DFFB mRNA was significantly higher in LACs as compared with SQCLCs. In addition, the expression of DFFB mRNA, but not of DFFA mRNA, was significantly higher in SCLC cell lines than in NSCLC cell lines. In conclusion, the present work indicates that DFF is expressed in lung carcinomas and lungs while the level of DFFA subunit-encoding mRNA in the tumors is upregulated in about one third of NSCLC patients. The activation of DFF and its regulation in lung cancer cells during apoptosis remains to be investigated. This work was supported by an institutional research project (No. MZO 00064211) from Ministry of Health, Czech Republic.

P100
Modulation of the effects of apoptotic inductors from the TNF family by dietary lipid components

Skender B., Hýžďalová M., Vaculová A., Kozubík A., Hofmanová J.
Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Science of the Czech Republic, v.v.i.; Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University
belma.sk@mail.muni.cz

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), important components of dietary fat, play a role in modulation of cytokinetic processes such as proliferation, differentiation and apoptosis. In this work, the main attention is paid to the effects of one representative n-3 PUFA, namely docosahexaenoic acid (DHA). This PUFA is discussed with regard to its ability to modulate the colon cancer cell apoptosis at the different levels of the intracellular signalling pathways. The role of DHA in regulation of apoptosis induced by tumor necrosis factor (TNF) family members, namely TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) is suggested. TRAIL is known to selectively induce apoptosis in cancer cells, while sparing the normal cells. However, there is evidence that some cancer cells are resistant to its effects
Our studies suggest that DHA can increase human colon cancer cell (HT-29, HCT-116) sensitivity to the apoptotic effect of TRAIL. Therefore, we investigated the effects of DHA, TRAIL and their combination on cell kinetics. We determined parameters reflecting changes of the cell cycle, viability and programmed cell death including some of important molecular determinants (caspases, DNA fragmentation, Bcl-2 family).
This work was supported by grants Nos. 524/07/1178 and 301/07/1557 GACR and No. 1QS500040507 ASCR.

P101
Transport of classical and novel taxanes in human cancer cells and in tumors of mammary gland

Ehrlichova M., Vaclavikova R., Horsky S., Mandys V., Gut I.
National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; Department of Pathology, 3nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic
ehrlichova@szu.cz

The classical taxanes (paclitaxel, docetaxel) have been successfully used in the therapy of various cancers, mainly breast and ovarian cancers. However, multidrug resistance (MDR) of tumor cells represents a problem in the chemotherapy employing taxanes. MDR is a significant cause of the failure of chemotherapy in tumors with inherent or acquired resistance due to enhanced expression of ABC transporters, especially P-glycoprotein (encoded by ABCB1). Novel taxanes (e.g. SBT-12854, SBT-1216) represent a new generation of taxoids particularly more effective in resistant cancer cells. We studied the transport of paclitaxel and novel taxanes in our established experimental model of cell lines MDA-MB-435 highly sensitive and NCI/ADR-RES highly resistant to classical taxanes. In addition, the transport was studied directly in the slices of tumors of mammary gland. The intracellular level and efflux of individual taxanes were measured by HPLC or by liquid scintillation using [14C] paclitaxel. We have demonstrated significantly higher resistance (100-fold) to paclitaxel in P-glycoprotein highly expressing NCI/ADR-RES cells in comparison to P-glycoprotein non-expressing MDA-MB-435 cells. The different accumulation is to a certain extent due both to the P-glycoprotein-dependent outward transport of the taxane and related lower uptake (approximately 4 to 5-fold). However, both cell lines also significantly differ in the expression of at least two other ABC transporters (ABCB5, ABCC2) which can be involved in the transport of taxanes. Our experiments with the transport of paclitaxel in human breast tumor slices also showed individual differences in the uptake individual patients and we presently prepare to compare the transport of novel taxanes in tumor slices. As novel taxanes are more efficient in resistant cancer cells, they seem to be potential candidates for therapy of classical taxane-resistant tumors. This work was supported by Grants IGA 9426-3 and GACR 305/07/P347.

P102

Superoxide dismutase 2 expression co-segregates with prognosis of breast cancer patiens

Hubackova M., Vaclavikova R., Kodet R., Mrhalova M., Kubackova K., Gut I., Soucek P.
Group for Biotransformations, Center of Occupational Medicine, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic and 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic; Group for Biotransformations, Center of Occupational Medicine, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic; Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic; Department of Oncology, Teaching Hospital Motol, Prague, Czech Republic; Group for Biotransformations, Center of Occupational Medicine, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; Group for Biotransformations, Center of Occupational Medicine, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic
hubackova@szu.cz

Background: Superoxide dismutase (SOD2, OMIM: 147460) acts as an antioxidant enzyme and it is localized in the mitochondrial matrix. SOD2 protects the cell from damage caused by excess of superoxide anion radical by its conversion to hydrogen peroxide. The aim of this study was to evaluate the importance of gene expression and polymorphism in SOD2 for development, progression and therapy outcome of breast cancer.
Materials and Methods: Level of SOD2 transcript was monitored in human carcinomas of the mammary gland, tissue without presence of tumor cells and in peripheral blood lymphocytes. Real-time PCR using absolute quantification and normalization to the expression of control gene cyclophilin A was used. Polymorphism in SOD2 (Ala16Val, rs4880) was determined in DNA samples by real-time PCR using TaqMan assay. Analyses were performed in 112 tumor samples, 47 paired non-tumor tissues and 26 lymphocytes.
Results: We observed high interindividual variability in SOD2 expression and higher expression in non-tumor than in tumor tissues ($p = 0.052$, t-test). We discovered correlation between SOD2 expression in non-tumor tissues and peripheral blood lymphocytes ($R = 0.579$, $p = 0.002$, Pearson chi-square test). In tumor samples, we found higher expression in patients with negative estrogen receptor ($p = 0.023$, ANOVA test). SOD2 expression was higher in non-tumor samples of patients with tumors larger than 20 mm and of premenopausal patients ($p = 0.062$; $p = 0.029$, respectively, ANOVA test). No other associations between SOD2 expression, polymorphism and clinical and pathological characteristics were found
Conclusions: Pilot study suggested that SOD2 expression may play a role in the development of breast cancer. SOD2 expression co-segregated with important prognostic factors as it was higher in tissues of patients with negative prognosis (i.e. premenopausal, T2-T4 and ER negative).
This study was supported by grants: IGA, no.: 9426-3 and GAUK, no.: 94507.

P103

Expression of proteinase inhibitor-9 in non-small cell lung carcinoma: effect of estradiol-17beta and interleukins

Roušalová I., Křepela E., Procházka J., Čermák J., Benková K.
Laboratories of Molecular and Cell Biology and Division of Surgery, Department of Pneumology and Thoracic Surgery, University Hospital Bulovka, Prague; Department of Pathology, University Hospital Bulovka, Prague
ilona.rousalova@seznam.cz

Background. Inactivation of the cytosol-delivered serine proteinase granzyme B (GRB) may lead to resistance of cancer cells against apoptosis triggered by cytotoxic lymphocytes. There is evidence that the proteinase inhibitor-9/serpinB9 (PI-9) can suppress the GRB-initiated apoptotic pathways in various cancer cells and thereby it can protect them from immune-mediated deletion. In this study, we examined the expression status of PI-9 mRNA and protein in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines and in NSCLC and lung tissues from surgically treated patients. Furthermore, we investigated the effect of estradiol-17beta (E2) and interleukins (ILs) on the expression of PI-9 in NSCLC cell lines. Methods. The expression of PI-9 mRNA was quantitated by real time RT-PCR. The expression of PI-9 protein was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. In NSCLC cell lines, the effect on expression of PI-9 was tested with E2 after 4 and 24 h of cultivation and with IL-1beta, IL-6 and IL-18 after 24 h of cultivation. Results. The expression of both PI-9 mRNA and protein was strong in six of ten examined NSCLC cell lines and it was weak in the remaining four ones. There was a significant positive correlation between the expression of PI-9 mRNA and protein in NSCLC cell lines. All examined tumor and lung tissues showed the expression of PI-9 mRNA while in 24 (16%) of 146 studied NSCLC patients the tumors had more than twofold higher level of PI-9 mRNA expression as compared to matched lungs. In NSCLC cell lines, the effect of E2 and ILs on the expression of PI-9 mRNA was rather variable and small. Conclusions. The present study provides evidence that the expression of PI-9 mRNA is upregulated in a subset of NSCLC cell lines and tissues. Our results also indicate that E2 and ILs do not positively regulate the transcriptional expression of PI-9 in NSCLC cells. This work was supported by a grant NR/7860-5 and a project MZO00064211 from the Ministry of Health, Czech Republic.

P104

Malondialdehyde as a prognostic parameter in squamous cell carcinoma of oral cavity and oropharynx

Tomandl J., Salzman R., Tóthová E., Pácal L., Kaňková K., Kostřica R.
1. Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine; Masaryk University, Brno; 2. Dept. of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; 3. Dept. of Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery, St. Anne's Faculty Hospital, Brno
tomandl@med.muni.cz

Oxidative stress and chronic inflammation certainly plays a significant role in head and neck carcinogenesis. Increased production of reactive oxygen species and metabolites such as malondialdehyde (MDA) a product of lipid peroxidation and cyclooxygenase activity may in turn induce DNA damage and mutations and, as a result, be carcinogenic.
The aim of the study was to investigate relationships between MDA and the oncologic characteristics and survival parameters of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).
Prospective study comprised a total 67 patients (57 men, 10 women, age 59.1 ± 8.8 years) who underwent surgical treatment for cancer of oral cavity and oropharynx. Patients had primary tumor localized in tonsil or base of tongue (42), anterior 2/3 of tongue (11) or floor of mouth (14). Staging according to the TNM classification was as follows: 6 patients as T1, 24 as T2, 7 as T3 and 30 as T4; 16 patients had no lymph node metastatic spread (N0), 14 patients were classified as N1, 35 as N2 and 2 as N3. Blood samples were collected on the 7th day after surgery, plasma immediately separated and aliquots were frozen to α75 ^{o}C. MDA was analyzed after derivatization with thiobarbituric acid by HPLC with fluorescence detection.
We found significantly different level of MDA in T1-2 and T3-4 patients ($p < 0.001$) and strong correlation between MDA and T-stages ($p < 0.0001$). Besides, the level of MDA was significantly elevated in patients who manifested disease relapse during 3 years following the surgical tumor removal ($p < 0.01$).
Our results confirm that advanced disease stages and recurrences in patients with HNSCC are accompanied by an increased oxidative stress.
Supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (NR/9200-3).

Přednášky

O41

Proteomová analýza membránových proteinů kmenů Francisella tularensis lišících se virulencí pro člověka: Strukturní a funkční studie DsbA a VacJ homologních proteinů

Stulík J., Pávková I., Strašková A., Hernychová L., Lenčo J.
Ústav molekulární patologie, FVZ UO Hradec Králové
jstulik@pmfhk.cz

Tularémie je onemocnění vyvolané gramnegativním, nitrobuněčným patogenem Francisella tularensis. Tento mikrob se vyskytuje ve dvou základních subtypech, které vyvolávají onemocnění u lidí, a to jako vysoce virulentní subtyp tularensis a méně virulentní subtyp holarctica. V současné době jsou informace o molekulární patogenezi infekce a klíčových faktorech virulence nedostatečné.
S cílem identifikovat nové faktory virulence mikroba Francisella tularensis jsme provedli srovnávací proteomovou analýzu frakcí obohacených o membránové proteiny, jež byly izolovány z vysoce virulentního kmene SCHUS4, subtyp tularensis, a tří zástupců subtypu holarctica zahrnující divoký izolát 130, avirulentní kmen 2062 a oslabený vakcinační kmen LVS. Mezi identifikovanými proteiny s rozdílnou expresí jsme identifikovaly dva hypotetické proteiny, které vykazovaly homologii k DsbA a VacJ proteinům, jež patří mezi faktory virulence u jiných bakteriálních druhů. Pro geny kódující tyto dva proteiny jsme připravili deleční mutanty a pomocí řady testovali jejich možné oslabení a také protektivní účnky. Zároveň byly provedeny analýzy zaměřené na studium jejich posttranslačních modifikací, a to na jejich acylaci a glykosylaci. Dále byla provedena proteomová studie delečního mutanta DsbA a byly identifikovány proteiny, jejichž exprese je signifikantně změněna odstraněním příslušného DsbA genu.
Tato práce byla podpořena projekty MOČR č. OPUFVZ200602 a GAČR č. GP310/06/P266

O42

Adenylate Cyclase Toxin Translocation Across Target Cell Membrane: Avoiding the Pore

Mašín J., Fišer R., Bumba L., Osičková A., Basler M., Krůšek J., Osička R., Konopásek I., Šebo P.
Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens, Institute of Microbiology; Department of Genetics and Microbiology, Charles University; Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology, Prague
masin@biomed.cas.cz

The Bordetella adenylate cyclase toxin (CyaA) targets phagocytes expressing the CD11b/CD18 integrin, permeabilizes their membranes by forming cation-selective pores and delivers into cells adenylate cyclase enzyme that dissipates cytosolic ATP into cAMP. We described activity of CyaA that causes elevation of [Ca2+]i in monocytic cells by a novel mechanism that is independent of its enzymatic or pore-forming activities and which requires structural integrity and membrane translocation of the AC domain polypeptide as such. An intriguing manifestation of AC domain translocation-mediated Ca2+ entry into cells was found to consist in relocalization of the CD11b/CD18 receptor from the bulk of the membrane into cholesterol and sphingolipid-rich microdomains. Relocalization of CyaA complex with CD11b/CD18 into lipid rafts enhanced the capacity to translocate AC domain across the plasma membrane. Using single cell patch-clamp and cytolysis assays we show that a combination of substitutions in the pore-forming and acylated domains ablates the cell-permeabilizing activity of CyaA without affecting its capacity to deliver the AC enzyme into cells. CyaA, hence, employs an unprecedented mechanism of membrane penetration that does not involve translocation of the AC domain across the toxin pore.

O43
Bacterial cell division – how the cell finds its center

Barák I., Muchová K., Pavlendová N., Chromiková Z.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia
imrich.barak@savba.sk

Probably the most controversial question regarding cell division of rod-shaped bacteria concerns the mechanism that ensures correct placement of the division septum. The earliest apparent event in cell division in bacteria is the formation of an FtsZ ring (Z-ring) at the future septation site. During vegetative growth of Escherichia coli and Bacillus subtilis, the Z-ring forms at mid-cell where the cells subsequently divide. At least two distinct mechanisms contribute to placement of the division machinery: the Min system and nucleoid occlusion. The idea that a concentration gradient in the Min system proteins serves as the measuring device for defining the mid-cell site of cell division is well established. The fluid mosaic model of membrane structure has been revised in recent years as it has become evident that domains of different lipid composition are present in eukaryotic and prokaryotic cells. Using membrane binding fluorescent dyes, we demonstrate the presence of lipid spirals extending along the long-axis of cells of the rod-shaped bacterium B. subtilis. These spiral structures are absent from cells in which the synthesis of phosphatidylglycerol is disrupted suggesting an enrichment in anionic phospholipids.
Green fluorescent protein fusions of the cell division protein MinD from B. subtilis also form spiral structures and these were shown by fluorescence resonance energy transfer (FRET) to be coincident with the lipid spirals. These data indicate a higher level of membrane lipid organization than previously observed and a primary role for lipid spirals in determining the site of cell division in bacterial cells. Little is known however of the origin of these spiral structures. Work in author's laboratory is supported by grants 2/7007/27 from SAS, by grants from the Slovak Research and Development Agency under the contract No. LPP-0218-06, No. ESF-EC-0106, No. APVT-51-0278 and by grant NMP4-CT-2004-013523 from the EC 6th Framework.

O44
Vlastnosti protilátok špecifických pre PB1-F2 protein virusu chripky typu

Košík I., Krejnusová I., Bystrická M., Poláková K., Russ G.
Virologický ústav, Ústav experimentálnej onkológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika
virugrus@savba.sk

Proteín PB1-F2 je kódovaný v alternatívnom (+1) čítacom rámci v géne PB1 vírusu chrípky typu A (IAV). Tento proteín má niekoľko neobvyklých vlastností ako napr. mitochondriálnu lokalizáciu v infikovaných bunkách a pro-apoptotické vlastnosti. Potvrdili sme prítomnosť PB1-F2 špecifických protilátok (Abs), v sérach experimentálne infikovaných myší ako aj v ľudských konvalescentných sérach počas chrípkovej epidémie. Skúmali sme či by PB1-F2 špecifické protilátky mohli mať nejakú ochrannú funkciu pri chrípkovej infekcii. BALB/c myši boli imunizované s N-terminálnym (3-13 aa), stredovým (42-53 aa) a C-terminálnym (71-83 aa) peptidom PB1-F2 proteínu, konjugovaným s keyhole limpet hemocyanínom. Desať dní po imunizácii boli myši infikované s 1 LD50 IAV. Ochranná funkcia Abs bola sledovaná prežívaním myší, titrom vírusu v pľúcach, a zmenou hmotnosti myší. V skupine myší imunizovaných s C-terminálnym peptidom prežilo 90% myší, zatiaľ čo v skupinách imunizovaných so stredovým a N-terminálnym peptidom prežilo len 60% myší. Protektívny efekt imunizácie s C-terminálnym peptidom bol sprevádzaný aj skorším vymiznutím vírusu z pľúc v porovnaní s myšami imunizovanými s ostatnými peptidmi. Na základe našich výsledkov predpokladáme, že Abs špecifické pre C-terminálny peptid PB1-F2 proteínu by mohli mať ochrannú funkciu voči infekcii s IAV. Tieto Abs by mohli brániť PB1-F2 proteínu uvoľnenému z infikovanej bunky usmrtiť neinfikované lymfocyty zhromaždené v mieste infekcie.

Práca je súčasťou projektu VEGA 2/6022/06 a APVV 1605/06.

O45
Čo nového v oxidačnej fosforylácii trypanozomatíd?

Horváth A.
Katedra biochémie PRIF UK, Bratislava
horvath@fns.uniba.sk

Oxidačná fosforylácia je za anaeróbnych podmienok najefektívnejší spôsob tvorby ATP v bunkách. V eukaryotických bunkách prebieha na vnútornej mitochondriálnej membráne. Do procesu sú zapojené multiproteínové enzýmy – komplexy I, II, III a IV dýchacieho reťazca a ATPsyntáza. Okrem tejto "klasickej cesty" boli v mitochondriách mnohých organizmov objavené aj viaceré alternatívne oxidázy, ktoré prenášajú elektróny medzi intermediátmi dýchacieho reťazca, no neprispievajú k tvorbe potenciálu na mitochondriálnej membráne.
Trypanozomatídy sú prvoky, z ktorých viaceré spôsobujú zdravotné a ekonomické problémy v mnohých častiach sveta. Parazitujú na veľmi širokom spektre organizmov. Navzájom sa odlišujú nielen svojimi hostiteľmi, ale aj životnými cyklami. Funkcia oxidačnej fosforylácie je vo viacerých druhoch vývojovo regulovaná a v niektorých životných štádiách potlačená, prípadne niektoré časti dýchacieho reťazca chýbajú úplne.
V našom laboratóriu študujeme enzýmy dýchacieho reťazca štyroch trypanozomatíd Trypanosoma brucei, Leishmania tarentolae, Crithidia fasciculata a Phytomonas serpens. Aj napriek vysokej príbuznosti uvedených druhov, sme medzi nimi detegovali viacero rozdielov v zložení celého reťazca ako aj jeho jednotlivých enzýmov. Komplex II a ATPsyntázu sme detegovali vo všetkých štyroch parazitoch; úplne funkčný komplex I je pravdepodobne prítomný len vo Phytomonas serpens, kde naopak chýbajú komplexy III a IV.

O46
Studium tvorby retrovirových částic a jejich terapeutické využití

Ulbrich P., Voráčková I., Haubová Š., Rimpelová S., Ruml T.
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Centrum aplikované genomiky, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, Praha 6
ulbrichp@vscht.cz

Snaha vyvinout účinný lék proti retrovirovým infekcím stále zůstává velmi aktuálním tématem. Studium životního cyklu těchto virů a jeho detailní pochopení může napomoci právě při hledání vhodných látek inhibujících tyto nebezpečné viry. Při studiu skládání retrovirových částic a úlohy nukleových kyselin v tomto procesu jsme vyvinuli vysoce účinný systém tvorby retrovirových částic in vitro. Tyto částice jsou za určitých podmínek vytvářeny přímo z purifikovaných strukturních virových proteinů Mason-Pfizerova opičího viru. Zabývali jsme se nejenom úlohou nukleových kyselin či jiných polyaniontů při tvorbě retrovirových částic, ale i vlivem různých fyzikálních podmínek či chemických činidel na proces skládání částic a výslednou strukturu těchto částic.
V poslední době se ukazuje jako velmi slibné využití pseudovirových částic jako dopravního systému či jako agens sloužícího pro účinné imunizace. Zjistili jsme že pokud prodloužíme na N-konci strukturní retrovirový protein o krátký oligopeptid, nedochází k ovlivnění procesu skládání částic a přitom je tento peptid vystaven na povrchu složené částice. Poměrem nemodifikovaného k modifikovanému proteinu lze i ovlivnit množství exponovaných peptidů na povrchu částic. Modifikovali jsme retrovirové částice jednak pro účely jejich vstupu do vybraných tkání, například do buněk rakoviny prostaty a jednak pro účinné imunizace. Pokud částice nesou na svém povrchu vhodný ligand rozpoznávající příslušný receptor na cílové buňce, lze předpokládat jejich vstup do těchto buněk. Pro imunizace byl vybrán oligopeptid, který je součástí prostatického membránového antigenu. Takto modifikované částice by tedy mohly být využity pro imunizace proti rakovině prostaty.
Tato práce je podporována granty 1M6837805002NR8797-4/2006, MŠM 6046137305, KJB 501270701.

O47
Trávicí peptidázy ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus*

Kopáček P., Horn M., Sojka D., Franta Z., Pěničková H., Caffrey, C.R., Mareš M.

Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice; Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha; Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases, UCSF, San Francisco
kopajz@paru.cas.cz

Klíště Ixodes ricinus je v současnosti nejvážnějším ektoparazitem v Evropě, který přenáší virus klíšťové encefalitidy a spirochety Lymské boreliózy. Dospělá samice I. ricinus nasaje během jednoho týdne až stonásobek své původní váhy, většinu strávené krve přemění na produkci vajíček, po jejichž vykladení hyne. Trávení krve klíšťaty probíhá intracelulárně v trávicích buňkách střevního epithelu. Naše znalosti o trávicích enzymech klíšťat byly dosud omezené na několik popsaných proteáz z různých druhů klíšťat. V naší práci jsme použili dvojí přístup – biochemický a genetický, abychom co nejkompletněji zmapovali trávicí aparát v klíštěti I. ricinus. Potvrdili jsme, že trávení krve klíšťaty je založeno na cysteinových a aspartátových peptidázách, které optimálně fungují v kyselém prostředí trávicích vakuol. Postupně jsme zaklonovali, osekvenovali a charakterizovali cysteinové peptidázy papainového typu – cathepsin B, L a exopeptidázu typu cathepsinu C. Dále jsme podrobně popsali asparaginylovou peptidázu (legumain) a aspartátovou peptidázu připomínající cathepsin D. Podobný sortiment trávicích enzymů využívají i krevní motolice rodu Schistosoma, naopak krevsající hmyz tráví pomocí aparátu serinových peptidáz. Podrobnou biochemickou a proteomickou analýzou peptidáz ve střevním homogenátu jsme zjistili, že klíštěcí cathepsin D působí zřejmě na počátku hemoglobinolytického štěpení. Vzniklé delší fragmenty hemoglobinu jsou pak dále štěpeny na kratší úseky pomocí výrazné aktivity papainů, zejména cathepsinu B, a jejich hydrolýza je dokončena cathepsinem C. Úloha klíštěcí asparaginylové endopeptidázy je zřejmě regulační, působící trans-aktivaci ostatních pro-enzymů trávicí kaskády. Hlubší pohled do molekulární podstaty trávení krve klíšťaty nabízí nalezení potenciálních „Achilových pat“ pro racionální kontrolu klíšťat i jimi přenášených patogenů.

(Podpořeno GAČR projektem č. 206/06/0865 a Výzkumným centrem LC06009)

Postery

P105
Interaction of Bordetella adenylate cyclase toxin with the integrin CD11b/CD18

Osička R., Morová J., Osičková A., Mašín J., Šebo P.
Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague
osicka@biomed.cas.cz

Adenylate cyclase toxin (CyaA) is a member of the RTX (Repeats in ToXin) family and a key virulence factor of Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough. CyaA delivers into cells an enzymatic adenylate cyclase domain, which catalyzes uncontrolled conversion of ATP to cAMP, a key signaling molecule subverting cell functions. Recently, CyaA was shown to use the beta 2 CD11b/CD18 integrin as a specific cellular receptor. We show that deglycosylation of cell surface proteins by glycosidase treatment, or inhibition of protein N-glycosylation by tunicamycin, ablates CyaA binding and penetration of CD11b-expressing cells. Competitive inhibition of CyaA binding to the integrin by excess of free sugars showed that CyaA directly recognizes the N-linked oligosaccharides of CD11b/CD18. Moreover, after initial interaction of CyaA with oligosaccharide chains, residues 614-682 of the CD11b subunit are crucial for specific binding of the toxin to target cells and their subsequent intoxication. Glycosylation of CD11a/CD18, another receptor of the beta 2 integrin family, was also essential for cytotoxic action of other RTX cytotoxins, the leukotoxin of Aggregatibacter actinomycetemcomitans (LtxA) and the Escherichia coli alpha-hemolysin (HlyA). These results show that binding and killing of target cells by CyaA, LtxA and HlyA depends on recognition of N-linked oligosaccharide chains of beta 2 integrin receptors and sets a new paradigm for action of RTX cytotoxins.

P106
Identification of the genes for ML-domain containing protein, Der-p2-like allergen and tick receptor for OspA in hard tick Ixodes ricinus: their role in vector-pathogen interaction

Horáčková J., Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.
Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích; Biologické centrum AV ČR, Parazitologický ústav, České Budějovice
janahora@seznam.cz

Tick Ixodes ricinus is the main vector of many pathogens in Europe. Differential expression of some tick genes is regulated by blood feeding or pathogen invasion. New genes encoding the proteins that are involved in tick innate immunity are presented below.
Genes encoding two proteins from ML (MD-2-lipid recognition) domain protein family, that are characterized by presence of ML domain with N-terminal signal peptide, six conserved cysteine residues and ß-rich structure, were unknown in hard ticks until now. Der-p2-like allergen and ML-domain containing protein have putative binding sites for lipids. Expression of both genes is strongly induced by blood intake, which can indirectly confirm the participation of these proteins in lipid transport or in recognition of lipidic molecules on the surface of the pathogens. Protein products of the genes belong to the group II of ML domain protein family among major allergen proteins, Niemann-Pick protein type C2 and other.
Expression of the gene encoding tick receptor for OspA of Borrelia burgdorferi (TROSPA) was induced in I. ricinus by infection with spirochaetes. TROSPA is known in I. scapularis where an important role plays in B. burgdorferi binding to tick's gut and its colonization. Analysis of the genomic sequence showed that this gene contains 2 exons (404 bp and 93 bp long) and one phase 2 intron (479 bp long). The genomic organization of I. ricinus TROSPA was similar to one of I. scapularis with small difference in the length of the first exon and with 93% of similarity on protein level. The nucleotide substitutions that caused the amino acid changes and several deletions in I. scapularis gene were observed in comparison to I. ricinus gene.
All studied genes and their protein products can participate in the interaction of the tick vector with spirochaetes or other pathogens. They probably can recognize and bind antigens on the pathogen surfaces.

P107
Tick(s) defense proteins: similarity, site of expression and stage-specific expression

Matějovská T., Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.
Biologické Centrum AV Č – Parazitologický ústav, České Budějovice; Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích
matejovska.tereza@gmail.com

While taking a blood meal, ticks encounter a large diversity of pathogens from hosts. One of the facets of the tick defense is a rapid and transient synthesis of a set of potent antibacterial peptides, following infection or trauma. With the growing problem of pathogens resistant to conventional antibiotics, ticks are becoming fruitful sources of novel pharmaceutical substances for treating infections. The study of the novel components of tick immunity, defensins, is the main area of our interest.
Recently, defensins were identified in Amblyomma americanum (1 isoform), A. hebraeum (2), Boophilus microplus (1), Dermacentor variabilis (2), Hyalomma longicornis (2), Ixodes scapularis (1), and Ornithodoros moubata (4). Some species expressed more than one defensin isoform. Their differential expression is induced by blood-feeding or pathogen invasion. Defensins are known for their antimicrobial activity against bacteria, fungi, viruses and protozoan parasites.
In Europe, Ixodes ricinus is the principal vector of several emerging infectious diseases of human such as Lyme disease and Tick-borne encephalitis (TBE). Recently, we showed that at least 2 isoforms of I. ricinus defensin are involved in its immunity. Def1 is expressed in midgut, while Def2 in midgut, ovary, malphigian tubes and salivary glands. Both peptides were induced by blood feeding in adult females, nymphs and larvae. They differ in 3 amino acids and show the intron/exon genomic structure. Among others, we found defensin peptides in D. reticulatus (1), D. marginatus (1), O. tartakovskyi (2), O. papillipes (3), O. puertoricensis (2) and O. rastratus (2). While mature parts of newly identified defensins were conserved among the species, the prepropeptides were rather heterogeneous. The diversity of defensins from different tick species might explain the competence of I. ricinus as a vector of B. burgdorferi and TBE virus in comparison to non-vector ticks.

P108
Searching for protein-protein interactions among the Bacillus subtilis spore coat proteins

Krajcikova D., Lukacova M., Mullerova D., Barak I.
Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia
Daniela.Krajcikova@savba.sk

When starved for nutrients, Bacillus subtilis cells initiate a series of genetic, biochemical and structural events that results in formation metabolically dormant endospores. Their capability to remain dormant for extended time and withstand extreme environmental conditions is mainly attributed to multilayer spore architecture. Protein shell encircling the spore called coat not only grants the spore resistance, but is also crucial for germination. Although more than 50 proteins have been identified to form the coat, so far we have rather limited knowledge how such a complex structure is assembled.
We have tried to reveal direct contacts among the proteins allocated to insoluble fraction of spore coat which represents about 30 % of all coat proteins. Using yeast two hybrid system we examined the interactions among the proteins CotX, CotY, CotZ, CotV and CotW, which form one gene cluster. We also tested a possibility of the direct contact with CotE, the crucial morphogenic protein identified in insoluble fraction as well. Out of 36 tested interactions six were have found as positive. We confirmed a previously published observation, that CotE forms homooligomers. In addition, we observed homotypic interaction in the case of CotY. Strong interaction was detected between CotZ and CotY and weak but significant interaction was found between the pair CotV-CotW. The positive results of yeast two hybrid analysis were confirmed by size exclusion chromatography and pull-down assays. The importance of coat proteins assembly for modern nano-technologies will be discussed.
Acknowledgement
Work in author's laboratory is supported by grants 2/7007/27 from SAS, by grants from Slovak Research and Developmental Agency under the contract No.LPP-0218-06, No. ESF-EC-0106, No. APVT-51-0278 and grant NMP4-CT-2004-013523 from EC 6th Framework.

P109

Ricinusin – nový antimikrobiální peptid z klíštěte Ixodes ricinus:třetí člen rodiny klíštěcích obranných peptidů bohatých na histidin

Dorňáková V., Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L.
Přírodovědecká Fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích; Biologické Centrum, Parazitologický ústav AV ČR v Českých Budějovicích
dornav00@prf.jcu.cz

Klíšťata tvoří jednu z důležitých skupin členovců (Arthropoda) významných vysokou rozmanitostí přenášených patogenních mikroorganismů (viry, bakterie a prvoci) z jednoho druhu živočichů na druhý. Přirozená imunita poskytuje klíštěti účinnou obranu proti invadujícím patogenům a je klíčem k pochopení mechanismu interakce mezi vektorem a patogenem. Hlavním aspektem klíštěcí obrany je rychlá a dočasná syntéza antimikrobiálních peptidů (AMPs), následující sání, infekci nebo trauma. Spektrum antimikrobiální aktivity je rozličné: většinou AMPs působí proti Gram-negativním i Gram-pozitivním bakteriím, ale také prokazují antimikrobiální aktivitu proti houbám, kvasinkám, virům nebo prvokům. Nový gen kódující antimikrobiální protein – ricinusin – byl charakterizován u klíštěte I. ricinus. Získaná 405 bp dlouhá cDNA obsahuje jeden čtecí rámec (135 aminokyselin), který kóduje protein velký 14.5 kDa s 19 aminokyselin dlouhou signální sekvencí. Diferenciální exprese ricinusinu byla indukována sáním u larvy, nymfy i dospělců. Výrazná exprese tohoto genu ve slinných žlázách a ve střevě ukázala, že ricinusin se podílí na širokém spektru imunitních reakcí. Analýza genomové sekvence ricinusinu neprokázala přítomnost intronů. Pro studium antimikrobiální aktivity ricinusinu a jeho účinnost proti zmíněným patogenům, včetně infekce bakterií Borrelia burgdorferi, byl za použití bakteriálního expresního systému získán rekombinantní protein. Analýza proteinové sekvence ricinusinu prokázala přítomnost unikátní HEAHEAHEA repetice a podobnost ricinusinu k AMPs z klíštěte Boophilus microplus a Amblyomma hebraeum se stejnými vlastnostmi. Ricinusin se tímto stal třetím členem nové rodiny klíštěcích obranných peptidů bohatých na histidin.

P110

Imunitná odpoveď myší po expozícii vtáčiemu vírusu chrípky bez jeho predchádzajúcej medzidruhovej adaptácie

Stropkovská A., Fislová T., Kostolanský F., Varečková E.
Virologický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava, SR viruastr@savba.sk
viruastr@savba.sk

Všetky doteraz známe subtypy vírusu chrípky (16 HA a 9 NA) cirkulujú vo vtáčej populácii ale len niektoré z nich (H1-H3, N1-N2) infikovali človeka a spôsobili epidémie. Hoci od roku 1997 boli zaznamenané ojedinelé chrípkové infekcie, kedy vtáčie vírusy subtypu H5, H7 a H9 priamo infikovali ľudí z vtáčích hostiteľov a prekonali tak medzidruhovú bariéru, nedošlo k ich ďalšiemu šíreniu v ľudskej populácii.

Primárnym rozdielom medzi vtáčími a ľudskými vírusmi je miesto ich replikácie. U ľudských subtypov je replikácia vírusu limitovaná na epitel dýchacích ciest, zatiaľ čo vtáčie vírusy sa replikujú predovšetkým v tráviacom trakte a môžu sa šíriť aj do iných orgánov. To súvisí s rozdielmi v receptorovej špecifite vtáčích a ľudských vírusov, v zmenách v polymerázovom komplexe a v rozdielnej citlivosti na proteázy, štiepiace prekurzor hemaglutinínu HA0 na fuzogénne aktívnu formu, esenciálnu pre infekčnosť vírusu. Tieto rozdiely bránia vtáčím vírusom v plnohodnotnej replikácii v cicavčom hostiteľovi bez ich predchádzajúcej adaptácie.

Cieľom tejto práce bolo porovnať imunitnú odpoveď myší po intranazálnej expozícii vtáčiemu vírusu chrípky subtypu H4 bez predchádzajúcej adaptácie na cicavčieho hostiteľa a porovnať s imunitnou odpoveďou na ľudský vírus chrípky subtypu H3. Sledovali sme replikačnú aktivitu vírusu v pľúcach myší, hladinu vírus-neutralizujúcich protilátok, spektrum protilátkovej odpovede voči jednotlivým vírusovým proteínom a expresiu cytokínov indukovaných po expozícii vtáčiemu a ľudskému vírusu chrípky.

Zistili sme, že i napriek obmedzenej replikácii vtáčieho vírusu v pľúcach myší, došlo po ich opakovnaej expozícii aj minimálnej dávke vírusu k výraznej stimulácii biologicky aktívnych protilátok, ktoré môžu mať profylaktický účinok pri kontakte s virulentnejším vírusom.

GP: VEGA 2/6077/6, 2/7065/7, APVV-51-021605

P111

Epitopová špecifita protilátkovej odpovede indukovanej ľahkým reťazcom hemaglutinínu vírusu chrípky počas chrípkovej infekcie ľudí

Staneková Z., Janulíková J., Fislová T., Mucha V., Kostolanský F., Varečková E.
Virologický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava, SR, viruzuza@savba.sk
viruzuza@savba.sk

Vírusy chrípky sa vyznačujú neobyčajne vysokou premenlivosťou, ktorá je dôvodom prečo doposiaľ neexistuje univerzálny spôsob prevencie voči chrípke. Preto sa dnes sústreďuje pozornosť na konzervatívne antigény vírusu chrípky so schopnosťou indukovať protektívnu imunitnú odpoveď.
My sme sa zamerali na ľahký reťazec hemaglutinínu (HA2), konzervatívnu časť hlavného povrchového antigénu vírusu chrípky A. Voči HA2 boli pripravené monoklonálne protilátky (MAb), ktoré sú intra- aj intersubtypovo reaktívne. Hoci nevykazujú vírus neutralizačnú aktivitu, niektoré inhibujú fúzogénnu aktivitu hemaglutinínu, redukujú replikáciu vírusu in vitro a chránia pred letálnou infekciou in vivo. Pomocou 7 MAb boli na HA2 definované štyri antigénne miesta. Cieľom tejto práce bolo zistiť, ktorý epitop ľahkého reťazca hemaglutinínu je imunodominantný počas chrípkovej infekcie ľudí.
Na epitopovú charakteristiku anti-HA2 protilátok prítomných v ľudských sérach sme použili kompetitívny ELISA test. MAb rozpoznávajúca príslušný epitop kompetovala so špecifickými protilátkami prítomnými v ľudských sérach o väzbu na daný epitop. V prípade, že v ľudských sérach boli prítomné protilátky špecifické k epitopu rozpoznávanému danou MAb, zaznamenali sme pokles väzby ľudských protilátok na HA2, spôsobený ich vytesnením s kompetujúcou MAb. V 45 konvalescentných sérach ľudí s diagnostikovanou chrípkou infekciou bolo pozorované 1,5- až 13,2-násobné zvýšenie titra HA2-špecifických protilátok oproti akútnym séram. Zistili sme, že v ľudských sérach sa počas chrípkovej infekcie tvoria špecifické protilátky voči úseku HA2 gp 125-175 aa rozpoznávanému s MAb IIF4. Rovnako sú analyzované všetky ľudské párové séra na prítomnosť protilátok špecifických voči ďalším epitopom na molekule HA2. HA2 epitopy, ktoré sú najimunodominantnejšie počas chrípkovej infekcie sú významné z hľadiska výberu vhodných konzervatívnych epitopov pre vakcínu so širším spektrom účinku.
GP: VEGA 2/6077/6, 2/7065/7 a APVV-51-021605.

P112

Immune function of alpha-2-macroglobulin (IrAM) in the hemolymph of the hard tick Ixodes ricinus

Burešová V., Hajdušek O., Franta Z., Sojka D., Kopáček P.
Biologické centrum AVČR, Parazitologicky ústav České Budějovice; Přírodovědecká fakulta JU České Budějovice
veronika@paru.cas.cz

Pathogens transmitted by ticks have to be apparently capable to evade humoral and cellular defense mechanisms of the vector. The broad spectrum protease inhibitors of alpha-2–macroglobulin family (alpha-2M) are believed to be important components of vertebrate and invertebrate innate immunity because they guard organism against undesired action of proteases of different origin, including those from invading pathogens. In our work, we studied the function of Ixodes ricinus alpha-2M (IrAM) in immune response against tick pathogen Chryseobacterium indologenes, Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi and commensal Staphylococcus xylosus. Elimination of IrAM activity by inactivation of its reactive thiol-ester with methylamine or depletion of IrAM from tick hemolymph by dsRNA interference led to the significant suppression of phagocytosis of C. indologenes by tick hemocytes. In contrast, phagocytosis of B. burgdorferi or S. xylosus was not affected. We have further demonstrated that involment of IrAM in C. indologenes phagocytosis is due to the interaction of the macromolecular inhibitor with the potent metalloproteases, known as the major virulence factor secreted by C. indologenes. We conclude that IrAM plays an important role in the remarkable clearance of C. indologenes from tick hemolymph. Noticeably, our results show for the first time the function of alpha-2M as an opsonin, which has been thus far known only for other members of this family, namely complement components or insect thiol-ester proteins (TEPs).
(This work was supported by grant IAA60022603 from GAAVCR and Research Cenre NO. LC06009)

P113
Sledovanie expresie mRNA génu NS1 ako infekčného markera vírusu chrípky typu A

Košík I., Krejnusová I., Bystrická M., Russ G.
Virologický ústav, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 , Bratislava, Slovenská republika
virukosi@savba.sk

Vírus chrípky typu A (IAV) ako jeden z najvýznamnejších respiračný patogénov zapríčiňuje ročne smrť približne polmilióna ľudí. IAV je obalený ssRNA vírus so segmentovaným génómom negatívnej polarity. Zdroj jeho úspechu pravdepodobne spočíva vo veľmi úzkom vzťáhu k hostiteľovi, zvýšenej mutabilite RNA genómu a v kontinuálnom evolučnom " zbrojení" v snahe prekonať immunitu. Keď vírus infikuje organizmus, vyvolá rapidnu vrodenú imunitnú reakciu, s cieľom vytvoriť antivirálny stav charakterizovaný inhibíciou replikácie vírusu. Kritickým komponentom je expresia interferónu α a ß (INF- α/ ß). INF indukuje expresiu protein kinázy R (PKR), ktorá po väzbe s dsRNA IAV nadobúda aktívnu konformáciu. Substrátom PKR je translačný elongačný faktor eIF2 α. Fosforylovaný eIF2 α nemôže vykonávať svoju funkciu a dochádza k zablokovaniu translácie a vírusovej replikácie.
IAV si v evolučnom zápase vytvoril účinnú obranu: NS1 proteín, ktorý blokuje vrodené imunitné reakcie na viacerých úrovniach. Prostredníctvom poly(A) viažucej domény sekvestruje celulárne mRNA (aj IFN mRNA) v jadre. RNA viažuca doména interaguje s U6 a U5 RNA a zabraňuje splicingu pre-mRNA, interakcia s transkripčnými faktormi IRF-3, NF- αB a AP1 inhibuje transkripciu INF. Ak však napriek uvedeným mechanizmom dôjde k produkcii PKR, NS1 pomocou dsRNA viažucej domény vychytáva dsRNA a PKR nenadobudne aktívny stav. Expresia NS1 odráža priebeh infekcie presne i v kontexte vakcinácie, liečby a imunizácie.
V našich experimentoch sme na myšom modeli sledovali protektívny vplyv imunizácie peptidmi derivovanými z PB1-F2 proteínu vírusu chrípky A/PR/8/34. Sledovali sme titer vírusu, hmotnosť a pomocou quantitatívnej PCR hladiny NS1. Výsledky experimentov poukazujú na protektívny vplyv imunizácie C terminálnym peptidom PB1-F2. Hladiny expresie NS1 mRNA korelujú s vysledkami rapid cellculture assay (RCA), čo potvrduje vhodnosť NS1 ako infekčný marker IAV. Práce je súčasťou projektov VEGA 2/6022/06 a APVV 1605/06.

P114
Pasívna imunizácia myší s protilátkami špecifickými pre PB1-F2 proteín vírusu chrípky typu A

Krejnusová I., Bystrická M., Russ G.
Virologický ústav, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika, viruinkr@savba.sk
viruinkr@savba.sk

Proapoptotický PB1-F2 proteín vírusu chrípky typu A (IAV) ovplyvňuje patogenézu chrípkovej infekcie. Predpokladáme, že bunky infikované s IAV môžu uvoľňovať PB1-F2 proteín, ktorý potom zabíja neinfikované bunky, najmä bunky imunitného systému, zhromažďujúce sa v mieste infekcie. Tvorbu protilátok špecifických pre PB1-F2 proteín (anti-PB1-F2 protilátky) sme už v minulosti dokázali po prekonaní chrípkovej infekcie u ľudí aj u myší. Našim cieľom bolo teraz preskúmať protektívny účinok protilátok špecifických pre PB1-F2 proteín vírusu chrípky A/PR/8/34. Za týmto účelom sme BALB/c myši pasívne imunizovali intravenóznym podaním anti-PB1-F2 protilátok. Na imunizáciu sme použili nami pripravené monoklonové protilátky AG55 a LB66 (MAbs), špecifické pre N-koniec PB1-F2 proteínu a taktiež protilátky IgG vypurifikované z myších sér po ich intraperitoneálnej imunizácii s fúznym proteínom PB1-F2-MBP (MBP – maltose binding protein, anti-PB1-F2-MBP protiláky). Po pasívnej imunizácii sme myši intranazálne infikovali s 50% letálnou dávkou IAV. Účinok imunizácie sme sledovali prežívaním myší, titrom vírusu v pľúcach a zmenou hmotnosti myší. Podanie MAbs AG55 a LB66 zhoršilo priebeh infekcie. V tejto skupine uhynulo 80% myší a došlo až k 25% úbytku hmotnosti. V kontrolnej skupine, ktorej bola podaná irelevantná MAb, uhynulo 75% myší a hmotnosť poklesla o 18%. Protektívny účinok sme nepozorovali ani pri imunizácii s IgG anti-PB1-F2-MBP. Prežívanie aj hmotnosť myší bola na úrovni kontroly, ktorej bol podaný MBP a kde uhynulo 70% myší. V skupine myší chránenej podaním anti-A/PR/8/34 protilátok prežilo 100% myší a maximálny pokles hmotnosti bol 13%, zatiaľ čo u ostatných skupín až 35%. Práca je súčasťou projektov VEGA 2/6022/06 a APVV1605/06.

P115
Fibrinogen-related proteins (lectins) in tick Dermacentor marginatus hemolymph

Dupejová J., Štěrba J., Vancová M., Kovář V., Grubhoffer L.
Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, České Budějovice, Czech Republic;
Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Science of the Czech Republic, Branišovská 31, České Budějovice, Czech Republic
dupejova@paru.cas.cz

FReD (fibrinogen-related domain) proteins are lectins with possible functions in invertebrate immunity. Previously, a FReD protein from the hemolymph of the tick Ornithodoros moubata, Dorin M, was isolated and characterised. In the present study, FReD proteins with hemagglutinating acitvity (HA) were identified in the hemolymph of the tick Dermacentor marginatus and characterised.
First, the binding specifity of these proteins was investigated. The most potent inhibitors of its HA were N-acetylhexosamines and sialoglycoproteins. Next, the FReD proteins were identified using antibodies (Abs) raised against Dorin M and HA of D. marginatus hemolymph. The identified proteins were examined for the presence of glycosylation and type of modifying glycans by Schiff-staining and lectin blotting (GNA, SNA, DSA, MAA, and PNA). Finally, hemolymph samples were subjected to deglycosylation using PNGase F and EndoH, and the deglycosylated proteins were detected using Abs against FReD proteins.
Four FReD proteins were detected using anti-Dorin M Abs, and all of them are glycosylated. The 36 kDa protein DMFREP1 is modified with glycan(s) of molecular weight approximately 9 kDa containing D-mannose and terminal D-galactose; the 79/80 kDa proteins DMFREP2 and DMFREP3 are oligomeric proteins with subunits of 58/66 kDa and 60/66 kDa, modified with small glycan(s) of molecular weight 4, 2, and 3 kDa containing D-mannose and terminal sialic acid. The 177 kDa DMFREP4 protein has two subunits of 86 and 90 kDa containing mannose; they were deglycosylated to the mass of 78 kDa. The prepared Abs were used in immunofluorescence localisation of the proteins in tick tissues – salivary glands, gut and hemocytes. DMFREP1 was localised to hemocytes and in salivary glands to epithelial cells of acines type III and secretion granules of acines type II. DMFREP2 was found in hemocytes and DMFREP3 in salivary glands only. All of the above proteins were found also in gut cells.

P116
Číslo 2 v dýchacom reťazci trypanozomatíd

Benkovičová V., Horváth A., Verner Z.
katedra biochémie PRIF UK, Bratislava, Biologické centrum, Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice, Česká Republika
benkovicova@fns.uniba.sk

Číslom 2 sú označované dva enzýmy prinášajúce elektróny do dýchacieho reťazca: 1. komplex II – sukcinát-dehydrogenáza; 2. NDH2 – alternatívna NADH-dehydrogenáza.
Sukcinát-dehydrogenáza je enzýmový komplex, ktorý prináša do dýchacieho reťazca elektróny transferom z redukovaného koenzýmu FADH2 na ubichinón bez pumpovania protónov cez mitochondriálnu membránu. Je to jediný enzým, ktorý je súčasťou procesu oxidačnej fosforylácie aj Krebsovho cyklu. Typický eukaryotický komplex II je heterotetramér rozdelený do troch domén: katalytická doména SDHA, podjednotka prenášajúca elektróny SDHB a dimérická membránová kotva SDHC/SDHD. Alternatívna NADH-dehydrogenáza je kódovaná len jediným génom; prenáša elektróny tiež na ubichinón, no jej substrátom je redukovaný koenzým NADH. NDH2 v niektorých bunkách úplne chýba, v niektorých alternuje činnosť komplexu I, prípadne ho úplne nahrádza, no bez tvorby membránového potenciálu. Gény obidvoch enzýmov boli dokázané aj v trypanozomatídach, no o ich vlastnostiach a význame sa vie len málo. Keďže funkčnosť komplexu I je v týchto parazitoch sporná, predpokladá sa, že v energetickom metabolizme trypanozomatíd hrajú „dvojky“ významnú úlohu.
Uvedené enzýmové aktivity sme študovali v štyroch rôznych trypanozomatídach – Leishmania tarentolae, Phytomonas serpens, Trypanosoma brucei a Crithidia fasciculata pomocou spektrofotometrického merania sukcinát-dehydrogenázovej aktivity a histochemickej detekcie priamo v géloch natívnej polyakrylamidovej elektroforézy a RNA interferencie. Vo všetkých sledovaných kmeňoch sme detegovali sukcinát-dehydrogenázovú aktivitu citlivú na malonát sodný – špecifický inhibítor komplexu II. Aktivita v jednotlivých trpanozomatídach sa výrazne odlišovala, rovnako ako paterny detegovaných aktivít v natívnych géloch.

P117

Functional analysis of the lysis genes of Streptomyces aureofaciens phage μ1/6 in homologous and heterologous host cells

Farkašovská J., Brnáková Z., Godány A.
Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava
zuzana.brnakova@savba.sk

Double-stranded DNA phages of both Gram-positive and Gram-negative bacteria typically use a holin-endolysin system to achieve lysis of their host. We are interested in studying the lysis system of phage mu1/6 which has a narrow host range for industrially important Streptomyces aurefaciens strains producing tetracycline. In a previous study, the entire double-stranded DNA genome of the phage mu1/6 was determined (GenBank accession number DQ372923) and analyzed. The two genes lyt and hol coding for endolysin and holin, respectively, were identified in the predicted lysis module of the phage mu1/6. They were cloned and expressed in Escherichia coli. An additional candidate holin gene, hol2, was found downstream of the hol gene based on one predicted transmembrane domain and a highly charged C-terminal sequence of the encoded protein. Expression of hol or hol2 in E. coli was shown to cause cell death. The concomitant expression of lambda endolysin (R) and mu1/6 holin resulted in cell lysis. Similarly, the coexpression of the endolysin and holin of phage mu1/6 led to lysis, apparently due to the ability of mu1/6 endolysin to hydrolyze the peptidoglycan layer of this bacterium. In contrast, our experiments showed that the membrane damage caused by Hol2 appeared not to be suffcient for lambda R or mu1/6 endolysin release. Demonstration of the holin function in streptomycetes was achieved by proving the release of mu1/6 endolysin to the periplasm and subsequent cleavage of the peptidoglycan, which strongly suggested that the holin produces lesions in the streptomycete membrane.

P118

Terapeutické využití pseudovirových částic

Voráčková I., Ulbrich P., Ruml T.
Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha
irena.vorackova@vscht.cz

V posledních letech narůstá počet studií věnujících se terapeutickému využití virových částic. Upravené virové částice se s výhodou používají např. jako vektory pro genové terapie či pro imunizace. Naše práce je založena na modifikaci povrchu retrovirových částic tvořených z části strukturního proteinu Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV). Již dříve byl v naší laboratoři vyvinut efektivní systém tvorby virům podobných částic M-PMV in vitro, kdy byly do vznikajících částic inkorporovány různé typy nukleových kyselin (RNA, DNA i jiné polyanionty). Strukturní retrovirový protein tvořící tyto částice byl modifikován na N-konci oligopeptidy, navržených tak, aby specificky interagovaly s receptory cílových buněk nebo sloužily jako antigen, neboť díky znalosti morfologie částic by měly být tyto modifikace vystaveny na jejich povrchu.
Byly vybrány peptidy, které by částice složené in vitro měly cílit do nádorových prostatických buněk a do endotheliálních buněk. K ověření možnosti využití částic pro imunoterapii byl vybrán peptid, který je součástí membránového antigenu buněk prostaty (PSMA). Částice s tímto povrchově exponovaným peptidem je možné využít k imunizaci proti výše zmíněnému membránovému proteinu produkovanému ve zvýšené míře při rakovině prostaty.
Ve všech třech případech se podařilo připravit modifikované částice jak v přítomnosti RNA, tak i DNA. Částicemi určenými pro imunizaci již byly imunizovány myši a nyní jsou testovány získané monoklonální protilátky. Také proběhly první pokusy vstupu modifikovaných částic do specifických tkáňových kultur.
Tato práce je podporována granty 1M6837805002NR8797, KJB 501270701 a SCO/06/E001.

P119
Structural and functional description of the four serpins from the tick ixodes ricinus

Chmelař J., Kotsyfakis M., Kopecký J.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice; Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA; Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice
chmelar@paru.cas.cz

Tick salivary glands produce hundreds of different transcripts encoding peptides with different roles either in the vector-host interaction or in the tick physiology. Here we present and describe four novel inhibitors of serine proteases from the serpin superfamily: IRS-1, IRS-2, IRS-4 and IRS-8 (IRS – Ixodes Ricinus Serpin). Three-dimensional models based on the resemblance to known serpin structures were made. Semi-quantitative and quantitative PCR were used to determine tissue and feeding stage specific expression of the four serpins. The tested serpins differ one from each other in numbers of transcripts in a single feeding stage. Moreover the expression dynamics of each serpin suggests different time of action during the feeding process.
Serpins were expressed in E. coli (BL21pLys) and refolded successfully from inclusion bodies. They were subsequently used for functional biochemical assays. The set of 10 serine proteases important for blood coagulation, digestion and immune response was used to determine serpins' inhibitory specifity. Possible role of the four described serpins for the tick physiology and host-vector interaction is discussed.

P120
Hemoglobin proteolysis in blood-feeding ticks: mapping of multienzyme cascade by functional proteomics

Horn M., Zikmundova-Nussbaumerova M., Sanda M., Franta Z., Sojka D., Kovarova Z., Srba J., Kopacek P., Mares M.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha; Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, and Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Ceske Budejovice
horn@uochb.cas.cz

Hemoglobin digestion is essential for the survival of blood-feeding parasites. Using chemical tools, we deconvoluted the intracellular hemoglobinolytic cascade in the hard tick Ixodes ricinus, a vector of Lyme disease and viral encephalitis. A set of peptidases was demonstrated in the tick gut tissue using visualization with activity/affinity-based probes, and activity profiling with selective peptidic substrates/inhibitors. Small molecule inhibitors were applied to dissect the roles of the individual peptidases and determine the peptidase-specific cleavage map of the hemoglobin molecule. The degradation process is initiated by endopeptidases of aspartic and cysteine class (cathepsins D and L supported by legumain) and continued by cysteine exopeptidases (cathepsins B and C). The identified enzymes are potential targets for developing novel anti-tick vaccines.
Acknowledgments: The work was supported by grants Nos. GACR 206/06/0865 and GAAVCR IAA400550617, and projects Nos. Z60220518 and Z40550506.

P121
Intracelulární transport polyproteinu Gag Mason-Pfizerova opičího viru

Grznárová P., Lipov J., Ruml T.
Ústav biochemie a mikrobiologie a Centrum aplikované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
petra.grznarova@vscht.cz

Cílem práce je vysvětlit regulaci intracelulárního transportu prekursoru strukturních proteinů polyproteinu Gag Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV). Samotný polyprotein Gag postačuje k vytvoření virům podobných částic v cytoplasmě transfekovaných buněk i in vitro. Byla sledována lokalizace jednak Gag divokého typu M-PMV, jednak fenotypově zajímavého mutantu R55FGag, který na rozdíl od nemutovaného typu tvořícího částice v pericentrionálním prostoru skládá částice až u cytoplasmy hostitelské buňky. Pro detekci proteinu a zjištění jeho lokalizace v buňkách byla použita vysoce senzitivní metoda s použitím nefluoreskujícího derivátu fluoresceinu FIAsH-EDT2, který specificky a s vysokou afinitou váže krátkou sekvenci tzv. tetracysteinový tag (TC) CCPGCC. Tak vzniká komplex, který po excitaci příslušnou vlnovou délkou emituje silný zelený fluorescenční signál. Pro tento účel byly navrženy a připraveny konstrukty pro wtGag-TC a R55FGag-TC v expresním vektoru na bázi pDsRed1-N1. Pro ověření úspěšnosti transfekce a pro optimalizaci metody byl dále navržen a připraven konstrukt pro DsRed-TC v expresním vektoru pDsRed1-N1, DsRed po excitaci emituje rudý fluorescenční signál. Všemi konstrukty byly transfekovány buňky buněčných linií COS-1 a HeLa. Lokalizace výsledných proteinů Gag-TC byla sledována pomocí inverzního mikroskopu Olympus v buňkách fixovaných formaldehydem v závislosti na čase.
Tento projekt je financován z grantů KJB501270701 a MSM6046137305.

P122
Differential gene expression of salivary gland proteins in Ixodes ricinus

Havlíková S., Roller L., Kazimírová M., Labuda M.
Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovakia; Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia
virusaha@savba.sk

Ticks are medically important vectors transmitting a great number of pathogens causing diseases of humans and animals, such as Tick-borne encephalitis (TBEV), Lyme disease, babesiosis and theileriosis. Ixodes ricinus is the major vector of TBEV and Borrelia burgdorferri sensu lato, the most important tick-borne pathogens in Central Europe. Tick salivary glands secrete a variety of pharmacologically active components which modulate host immune, haemostatic and inflammatory responses. Recently, tick sialomes have been explored for potentional anti-tick and transmission blocking vaccine candidates. However, temporal and spatial expression of these candidates in the tick body is poorly known.
The cement protein 64P (Rhipicephlaus appendiculatus), the conserved protein, subolesin 4D8 (Ixodes scapularis) and the salivary gland secreted protein, salp15 (Ixodes scapularis) belong to antigens with protective effects. We cloned cDNAs encoding related proteins in Ixodes ricinus and localized their gene transcripts in salivary glands of the ticks. Expression pattern of transcripts for the Ra 64P related protein, Ir p9.6 from I. ricinus, was studied. We localized transcripts of Ir p9.6. The highest level of mRNA was observed exclusively in acinar ducts of salivary glands of I. ricinus females feeding for 2- and 3-days.
A remarkable distinction in transcription of salp13.2, a salp15 related protein, was observed during the feeding course of I. ricinus. The strongest staining of salp 13.2 transcripts was observed in specific salivary glands acini type II at the beginning of feeding, i.e. in one day fed female ticks.
Robust production of 4D8 mRNA was detected in salivary glands acini type III of unfed I. ricinus females. The transcription of 4D8 was down-regulated during feeding.
All analyzed genes for salivary gland proteins displayed very specific expression patterns which may elucidate their roles in the tick feeding.

P123
p36 gene expression in salivary glands of Amblyomma variegatum and Dermacentor reticulatus ticks

Peterková K., Koči J., Roller L., Kazimírová M., Slovák M., Hajnická V.
Virologický ústav SAV v Bratislave; Virologický ústav SAV v Bratislave; Ústav zoológie SAV v Bratislave; Ústav zoológie SAV v Bratislave; Ústav zoológie SAV v Bratislave; Virologický ústav SAV v Bratislave
virukami@savba.sk

Lately, the tick research aims its effort to mine novel secretory products from tick salivary glands due to their potential in anti-tick vaccine development. A consequence of such endeavour is an informational explosion about attributes of the tick salivary gland secretory products, such as modulation the host haemostatic, inflammatory and immune responses. One of those substances well-described so far is an immunomodulatory protein produced in salivary glands of Dermacentor andersoni tick, named Da-p36.
Sequences coding two proteins in salivary glands of A. variegatum a D. reticulatus ticks using RACE PCR with degenerate primers, were found. Novel proteins were compared to proteins from various databases. Based on similarity to the protein Da-p36 our proteins were entitled Av-p36 and Dr-p36 (Identity Av-p36:Da-p36=34%; Dr-p36:Da-p36=43%; Av-p36:Dr-p36=35%).
In this study we ascertained gene expression for Av-p36 and Dr-p36 in male and female ticks during feeding on laboratory rabbits. qPCR and in situ hybridization were used. Results show that unfed D. reticulatus ticks do not express Dr-p36. In course of tick feeding Dr-p36 expression begun at day 2 and culminated at day 4. In females Dr-p36 expression decreased during days 6 and 8. Curiously, in the fully engorged females we again detected high expression level. In contrast to females, Dr-p36 expression in males did not change after day 4.
In turn, low expression levels of Av-p36 mRNA were detected even in unfed male and female A. variegatum ticks. Av-p36 mRNA expression in male ticks increased up to the day 4 after which it slightly decreased until the completion of feeding. In female ticks Av-p36 expression raised basically up until the end of feeding, however, in engorged females we measured decreased expression levels only.
Our results suggest that variability in Av-p36 and Dr-p36 expression in feeding A. variegatum a D. reticulatus ticks might be caused by different ethology of these two tick species.

P125
Genetic variability of prophages from salmonella strains

Drahovská H., Szemes T., Šoltýsová A., Tóthová Ľ., Al-Alami H., Turňa J.
Department of Molecular biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic
drahovska@fns.uniba.sk

Bacteriophages represent one of major mobile genetic elements that contribute significantly to horizontal gene transfer in bacterial genomes. Bacteria, including Salmonella enterica, may contain multiple prophages that constitute a substantial part of their genomes.
In presented work the sequence variability of prophage genes integrated in salmonella genomes was studied. We screened for diversity of 45 S. Typhimurium strains of veterinary origin using PCR detection of selected prophage regions derived from phages P22, Gifsy-1, Gifsy-2, Fels-1, ST104 and SopE. We observed a high degree of variability in presence of specific genes. We partially sequenced four genes of P22 phage (gtrC, g8, eac, sieB) and the g45 gene of ST104 phage in strains. We detected 2-7 different alleles in every gene; sieB was the most polymorphic one. In the second part, phages induced from Salmonella strains were further studied. By plating on indicator strains we observed that 45 from 47 Salmonella strains released phages. Induced phages were characterized by PCR detection with primers targeted to genes derived from salmonella phages. The ST104 and ST104-related phages were confirmed to be present in phage lysates. The obtained results have shown great variability of prophages in S. Typhimurium and simultaneously they can be used for discrimination of closely related S. Typhimurium strains in epidemiologic studies. We observed similar grouping of salmonella strains in case of PCR-prophage detection and MLVA (multilocus VNTR analysis) typing and results corresponded well with the phage type of strains. However, we detected several salmonella strains, which were closely related according to MLVA, yet they differed in PCR phage profiles. Our observations support a view that integration/excision of bacteriophages in salmonella strains are frequent events shaping the bacterial genome.

P126
Evidence of gene sequence variability among Murine gammaherpesvirus (MHV) strains 72 and 4556

Halásová Z., Valovičová M., Belvončíková P., Mačáková-Reinhardt K., Kúdelová M.
Virologický ústav SAV, Bratislava
virukude@savba.sk

MHV originally isolated at the territory of Slovakia and later on also of Bohemia from bank vole has been developed as a small animal model for addressing basic aspects of pathogenesis and immunity of human oncogenic gammaherpesviruses (EBV and KSHV) causing severe infection of humans, in particular in immunosuppressed individuals such as transplant. Together eight isolates of MHV (60, 68, 72, 76, 78, Šumava, 4556, and 4582) were purified from rodents Clethrionomys glareolus and Apodemus flavicolis and their biological properties were shown very similar but not the same. In this study, firstly MHV72 (clone h3.7) and MHV4556 (clone i2.8) genome was assessed by restriction analyses. Then, gene sequence variability in proteins encoding capsid, tegument, and envelope proteins having homologues in other gammaherpesviruses as well as in those unique for MHV was evaluated. Comparing the sequence of 34 genes of MHV72 and MHV4556 with that of their MHV68 counterparts we identified 25 strain specific mutations. Among structural genes, the most likely attributing different pathogenicity of MHV72 and/or MHV4556, mutations in both strains were found in ORF26, ORF48, and ORF52. Mutations were also confirmed in ORF20 and gp150 gene for MHV72 and in gB gene for MHV4556. No mutations were found in ORF27, ORF28, ORF39, ORF45, ORF47, and M9. For almost all structural proteins secondary structure changes resulted into changes in their hydrofilicity and surface exposure. In both strains studied we identified 4 mutations also in immune evasion genes M3 and MK3 suggested to modulate the course of lytic/latent infection. Knowledge about diversity among MHV strains would contribute to the understanding of viral gene functions in virus-host interaction, thereby further enhancing the potential of this model.
This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract APVV-51-005005 and by VEGA (#2/7906/27).

P127
FerA from Paracoccus denitrificans participates in iron utilization

Sedláček V., Kučera I.
Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno
21931@mail.muni.cz

The ferA gene from Paracoccus denitrificans encodes the 180 amino acids long protein with a molecular mass 18.9 kDa. BLAST searching against protein databases (UniProt, PDB) classified the protein among flavin reductases (PF01613). The enzyme was able to reduce ferriparabactin with lower electrochemical potential in the presence of a ferrous chelating agent. The knock-out mutation of the ferA gene by a kanamycin cassette decreased significantly growth abilities of the strain and diminished its production of catechol siderophores during aerobic cultivation on a mineral medium. Partial restoration of properties typical for the wild strain was observed for the mutant strain with a complementation of the disrupted ferA gene by its intact form carrying on a pEG400 plasmid. 1 mM chorismic acid had similar effect on the mutant as the complementation.
Acknowledgement: This work was supported by the grants of the Grant Agency of the Czech Republic (525/07/106) and the Ministry of Education, Youth and Sports (MSM 0021622413).

P127A
Strukturní a funkční studie mutantů T41I/T78I a Y28F/Y67F matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru

Prchal J., Doležal M., Vlach J., Lipov J., Rumlová M., Hrabal R., Ruml T.
Laboratoř NMR, Vysoká Škola Chemicko-Technologická v Praze; Ústav Biochemie a Mikrobiologie, Vysoká Škola Chemicko-Technologická v Praze
prchalj@vscht.cz

Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV) je modelovým organismem pro D-typ retrovirů. Matrixový protein (MA) je zodpovědný za interakci virionu s cytoplasmatickou membránou. MA interaguje s cytoplasmatickou membránou pomocí zbytku kyseliny myristové, kovalentně připojeného k N-konci MA.
V naší práci se zabýváme jeho dvojitými mutanty T41I/T78I a Y28F/Y67F, které zabraňují pučení nezralých virových částic ven z buňky. Předpokládáme, že vnesení hydrofobních aminokyselin vede ke zvýšení hydrofobicity jádra proteinu, což brání uvolnění zbytku kyseliny myristové pro interakci s cytoplasmatickou membránou.
V naší laboratoři jsme doposud určili strukturu nemyristoylované formy divokého typu M-PMV MA a obou mutantů pomocí izotopově podporované NMR spektroskopie. Ze srovnání struktur divokého typu a mutantů vyplývá, že mutací nedošlo k významné změně celkové struktury mutantních proteinů. Zmutované aminokyseliny jsou ovšem na rozdíl od původních orientovány do jádra proteinu. Ze srovnání chemických posunů myristoylovaných a nemyristoylovaných forem matrixových proteinů vyplývá, že zbytek kyseliny myristové je zanořen hlouběji do jádra proteinu, což podporuje hypotézu o interakci mutovaných aminokyselin se zbytkem kyseliny myristové vedoucí k zablokování její interakce s cytoplasmatickou membránou.

Práci podporovali MŠ 1M6837805002, MSM 6046137305, a ME 904, GAČR 203/07/0872 a 980/137/566.

P127B
Lipid rafts serves as platform for translocation of Bordettella pertussis adenylate cyclase toxin

Bumba[1,*] L., Masin[1] L., Fiser[2] R., Sebo[1] P.
[1] *Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic;*
[2] *Faculty of Natural Sciences, Charles University, Vinicna 7, 120 00 Prague 2, Czech Republic. **
bumba@biomed.cas.cz

Bordetella pertussis produces an adenylate cyclase toxin-hemolysin (CyaA) that targets myeloid phagocytic cells expressing the alphaM-beta2 integrin receptor (CD11b/CD18). CyaA permeabilizes cellular membranes by forming small cation-selective pores, and delivers directly across the cytoplasmic membrane a calmodulin-activated adenylate cyclase (AC) domain that catalyzes unregulated conversion of cytosolic ATP into cAMP. Translocation of AC domain is also accompanied by an entry of extracellular calcium ions into cells and elevation of cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$), an event that is independent of the CyaA-CD11b/CD18 interaction. Using the murine monocyte-macrophage J774.A1 cell line as model, we found that shortly upon CyaA binding to CD11b/CD18, initially distributed diffusely in the cytoplasmic membrane, a CyaA-CD11b/CD18 complex is formed and recruited into cholesterol and sphingolipid-rich membrane regions, known as lipid rafts. The recruitment of the CyaA-CD11b/CD18 complex correlated with calpain-mediated cleavage of talin and could be blocked by calpeptin, a specific inhibitor of the calcium-activated protease calpain. Binding of CyaA mutants unable to elevate $[Ca^{2+}]_c$ failed to promote recruitment of the CyaA-CD11b/CD18 into lipid rafts, showing that this early manifestation of CyaA action depends on its capacity to raise $[Ca^{2+}]_c$. In addition, the $[Ca^{2+}]_c$ increase triggered by only extracellular but not intracellular calcium ions was effective to recruit the complex into lipid rafts. The association of CyaA within lipid rafts was essential for efficient translocation of AC domain. Depletion of cholesterol from plasma membrane using methyl-beta-cyclodextrin treatment showed a significant decrease in cAMP intoxication of the cell. The cAMP intoxication was also inhibited by calpeptin inhibitor, which blocks the recruitment of CyA-CD11b-CD18 into lipid rafts. These data demonstrate that lipid rafts serve as a platform for efficient translocation of AC domain and subsequent intoxication of target cells by cAMP.

Přednášky

O48

Vítěz Ceny Arnolda Beckmana – genomika, genetika (Martin Hřebíček): Mutations in TMEM76 are associated with acetyl coenzyme A: a-glucosaminide N acetyltransferase deficiency in mucopolysaccharidosis type III C (Sanfilippo C) patiens

Hřebíček M., Kmoch S., Mrázová L., Majewski J., Nosková L., Hartmannová H., Ivánek R., Čížková A., Poupětová H., Sikora J., Uřinovská J., Stránecký V., Zeman J.
Institute for Inherited Metabolic Disorders and Center for Applied Genomics, Charles University 1st School of Medicine, Prague; Department of Human Genetics and Genome Quebec Innovation Centre, McGill University, Montréal
Key words: MPSIIIC, Sanfilippo C, linkage, mapping, gene, TMEM76

Mucopolysaccharidosis type IIIC (MPS IIIC) is caused by a deficiency of the acetyl-coenzyme A: @-glucosaminide N-acetyltransferase (N-acetyltransferase), leading to impaired degradation and lysosomal storage of heparan sulfate. To identify the MPSIIIC gene we assessed 54 individuals from four Czech MPS IIIC families. Measurement of N-acetyltransferase levels in leukocytes unambiguously classified affected, carriers, and non-carriers and allowed us to performed linkage analysis under an autosomal codominant model. We genotyped 18 microsatellite markers located in a recently identified *MPS IIIC* locus on chromosome 8. In all families we confirmed the linkage to *MPS IIIC* region with a maximum LOD score of 7.8 at D8S531 and identified several recombination events that narrowed the candidate region between markers D8S1115 and D8S1831 and physical coordinates 42655724-51968859 Mbp of chromosome 8. Integrated bioinformatic search and gene expression analysis of all the genes located within the candidate region on focused oligonucleotide microarray pinpointed a single gene *TMEM76* with significantly decreased expression in patient samples and coding for a protein with multiple transmembrane domains and glycosylation sites. Sequence analysis of the *TMEM76* showed that all five patients from analyzed families are compound heterozygotes for eight different mutant alleles. Five mutations are predicted to result in truncated products (L321X, R384X and R506X, 16 bp deletion I345fs, and splicing mutation IVS9+5G>A). The rest are missense mutations R344H, M482K and P571L affecting the residues conserved among multiple species and located either in the predicted transmembrane regions or in their close vicinity. All the mutations completely segregated in the families with the phenotype based on the enzyme assay, which provides support that *TMEM76* is the gene encoding N-acetyltransferase deficient in MPSIIIC patient.

O49

Vítězka Ceny Arnolda Beckmana – buněčná biologie a imunologie (Lubica Dráberová): Komplexnost aktivačních dějů na plasmatické membráně

Dráberová L., Dráber P.
Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i.
draberpe@img.cas.cz

Molekulární mechanismy vedoucí k přenosu signálu z některých důležitých membránových receptorů do nitra buňky zůstávají záhadou i když se na ně zaměřuje pozornost řady pracovišť. V případě signalizačních kaskád vedoucích od membránových imunoreceptorů je současný výzkum soustředěn na tři hlavní oblasti: (I) identifikace všech molekul, které se podílí na přenosu signálu, (II) identifikace všech relevantních inter- a intra-molekulárních interakcí a (III) pochopení aktivačních dějů v jejich komplexnosti. Na příkladu studia molekulárních mechanismů přenosu signálu od vysokoafinitního receptoru pro imunoglobulin E (FcεRI) u žírných buněk budou uvedeny výsledky naší laboratoře ve všech třech oblastech výzkumu. Značnou pozornost jsme věnovali pochopení funkce nově objeveného adaptorového proteinu NTAL (non-T cell activation linker), který reguluje FcεRI signalizaci jak v pozitivním tak i negativním smyslu (J. Exp. Med., 200: 1001-1013, 2004 a J. Immunol., 179: 5169-5180, 2007). Komplexnost inter- a intra- molekulárních interakcí bude dokumentována na příkladu vztahu mezi restrukturalizací buněčného povrchu po agregaci FcεRI, fosforylací fosfolipidové skramblázy a uvolněním sekrečních granul (J. Biol. Chem., 282: 10487-10497, 2007 a J. Biol. Chem., 283: 10904-10918, 2008). Konečně, komplexnost ale i komplikovanost studia aktivačních dějů bude dokumentována na příkladu vývoje názorů na možné mechanismy fosforylace FcεRI Lyn kinázou; jedná se o první dobře definovaný biochemický krok FcεRI signalizační cesty. Současný výzkum ukazuje, že nové metodické přístupy systémové biologie jsou nezbytné pro pochopení aktivačních dějů v jejich komplexnosti.

O50
Nukleázy u *Streptomyces aureofaciens* a *Streptomyces coelicolor*

Brnáková Z., Godány A.
Ústav Molekulárnej Biológie SAV v Bratislave
zuzana.brnakova@savba.sk

Streptomycéty, patriace medzi Gram-pozitívnych baktérie, tvoria veľmi dobre vyvinuté rozvetvené mycélium, dôsledkom čoho sú kompaktné kolónie na pevných agarových médiách. Z morfologického hľadiska, tvorba substrátových hýf, v ďalšej fáze vzdušného mycélia, jeho následnej fragmentácie a sporulácie je podobná rastu a diferenciácii húb, a preto sa tieto vláknité baktérie často považujú za hraničné mikroorganizmy. Nábeh rastu vzdušného mycélia a jeho transformácia do spór sú doprevádzané zjavnou lýzou substrátových hýf, popričom sa využívajú substráty predtým akumulované vo vegetatívnom mycéliu. Fenomén lýzy a degradácia DNA v substrátovom mycéliu sa môžu považovať za programovanú smrť buniek a zaraďujú sa medzi vývojové programy adaptácie baktérie k prostrediu. Podľa predchádzajúcich hypotéz by sa DNA vegetatívneho mycélia mohla recyklovať prvotným pôsobením deoxyribonukleáz, doteraz však existuje pomerne málo údajov o prítomnosti alebo ich charakterizácii týchto enzýmov u streptomycét. Niekoľko nukleáz, ktoré by mohli spĺňať tieto vlastnosti, boli izolované a biochemicky charakterizované najmä u S. antibioticus, ďalšie u S. glaucescens, S. tendae a S. thermonitrificans, nie je však známa ich biologická funkcia. Nukleázy však zohrávajú dôležité úlohy aj v replikácii, rekombinácii, restrikcii, opravách nukleových kyselín a nutrícii. Táto práca bola zameraná na nukleázy z kmeňov S. coelicolor A3(2) a S. aureofaciens B96. Gény nešpecifických deoxyribonukleáz modelových kmeňov boli amplifikované a klonované v expresných E. coli vektorových systémoch. Ich homológia a vlastnosti boli porovnané s inými prokaryotickými a eukaryotickými organizmami a ich funkcia bola analyzovaná pomocou génovej inaktivácie v pôvodných hostiteľoch.

O51
Adaptative changes in the succinate transport into mycelia of Trichoderma viride

Olejníková P., Lakatoš B., Hudecová D., Varečka Ľ.
Department of Biochemistry and Microbiology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 81237-Bratislava, Slovak Republic
petra.olejnikova@stuba.sk

Submerged growth of Trichoderma viride F534 was accompanied by the excretion of organic acids. The excretion of succinate by glucose-grown mycelia was observed at millimolar concentration, and succinate completely disappeared from the growth medium after 70 h of cultivation. A lack of succinate in medium could possibly result from the activation of the succinate inward transport by succinate, which we demonstrate in this work. Glucose-grown hyphae required an adaptation period of 10-12 hours before the uptake of succinate into mycelia was initiated. In contrast, succinate-grown hyphae started to take up succinate immediately. Uptake of succinate was completely inhibited by NaN3 (5 mmol/l), TCS (15 Ḳmol/l) and vanadate (1 mmol/l), and had a pH optimum at pH 5, temperature optimum at 37°C and displayed the typical saturation. 2-oxoglutarate and citrate partially inhibited the uptake of succinate, which indicates that they could act as competitive inhibitors of the succinate transport. Succinate-grown hyphae were able to take up 2-oxoglutarate and citrate with transport rates similar to succinate uptake. In addition, the increase in vanadate-sensitive ATPase activity in succinate-grown hyphae and the inhibition of succinate uptake by an uncoupler (TCS) and by vanadate suggest that succinate uptake in these strains depends on the proton motive force. These observations indicate that the inward-directed succinate transport could be H+ – ATPase dependent. Partial sequence of H+ – ATPase was obtained and increased expression of H+ – ATPase during the early phase of adaptation to succinate was demonstrated.
This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA grant No.1/0462/08 and APVT-20-003904

O52
Využitie povrchových proteínov Streptococcus agalactiae na detekciu a vývoj vakcíny

Vidová B., Godány A.
Ústav molekularnej biológie SAV v Bratislave
b.vidova@gmail.com

Streptococcus agalactiae je jedným z najdôležitejších patogénov dobre známym v humánnej medicíne, kde býva hlavnou príčinou život ohrozujúcich bakteriálnych infekcií u novorodencov; ako aj vo veterinárnej praxi, kde je pôvodcom mastitídy, čiže zápalu mliečnej žľazy u prežúvavcov. Náhradou za v súčasnosti rozšírenému liečeniu antibiotikami by mohla byť vakcína proti S. agalactiae, kedy by si organizmus hostiteľa sám vytváral protilátky proti tomuto patogénu. Nádejnými kandidátmi pre vývoj vakcíny by mohli byť povrchové proteíny. Väčšina kmeňov S. agalactiae exprimuje na svojom povrchu jeden a viac zakotvených proteínov vyskytujúcich sa v závislosti od jednotlivých kmeňov. Štúdium týchto proteínov je dôležité pre pochopenie patogenézy a epidemiológie infekcií, pričom niekoľko z nich už bolo využitých v konjugovaných vakcínach, kde úspešne indukovali tvorbu protilátok u hostiteľa. Táto práca bola zameraná na charakterizáciu variability génov kódujúcich povrchové proteíny patriace do rodiny „alpha-like“ a povrchovo-imunogénny proteín Sip. Vyvinuté boli multiplex PCR metódy pre identifikáciu génov kódujúcich povrchové proteíny, a tieto boli použité na ich charakterizáciu, výskyt a variabilitu v izolátoch S. agalactiae bovinného pôvodu. Týmto prístupom boli identifikované izoláty nesúce sekvencie génov kódujúcich nové „alpha-like“ proteíny alp6 a alp7. Sekvencia kódujúca povrchový proteín Sip bola detegovaná v zbierke bovinných izolátov, pričom vykazovala vysokú identitu aj jedinečnosť pre S. agalactiae. V géne bola pozorovaná variabilita, jeho časť vykazovala vysokú sekvenčnú homológiu, a tak práve táto je vybraná na druhovo-špecifickú detekciu S. agalactiae, pričom sa môže v nej potenciálne nachádzať aj epitop využiteľný pre vývoj vakcíny proti tomuto patogénu. Amplifikované sekvencie jednotlivých génov povrchových proteínov boli klonované a exprimované v pET a v T7 phage display expresných systémoch a sú pripravené na imunizáciu v zvieracích modeloch.

O53
Modulation of adrenergic receptor´s gene expression in the spleen of rats exposed to repeated immobilization stress

Laukova M., Tillinger A., Vargovic P., Petrak J., Krizanova O., Kvetnansky R.
Ústav experimentálnej endokrinológie, SAV, Bratislava; Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Bratislava
marcela.laukova@savba.sk

The physiological response to sympathoadrenal activation is mediated by catecholamines (adrenaline, noradrenaline) via adrenoceptors (ARs). Stress-induced elevation of noradrenaline and adrenaline levels is well established response of the organism, which stimulates changes also in immune organs. The aim of our work was to measure gene expression of ARs in spleen of rats exposed to immobilization stress (IMMO). We found a significant increase in mRNA levels of alpha1B AR in the spleen of rats exposed to repeated (14x) IMMO as well as an increase of beta2 AR in rats exposed to a single (1x) and repeated (14x) IMMO. We detected increased levels in alpha2C AR after a single IMMO, but considerable decreased levels in alpha2C and alpha2A AR mRNA after repeated IMMO. We did not find any changes in gene expression of beta1, beta3 and alpha1D ARs. Our results suggest different regulation of individual types of splenic adrenoceptors by IMMO stressor. It is known that exposure to acute stress produces a short-term elevation of splenic noradrenaline (NA), while chronic stress induces long-lasting depletion of splenic NA and a rise in splenic adrenaline. This stress-induced elevation in catecholamine levels results in modulation of adrenoceptor gene expression followed by increased response to immune reaction. Nevertheless, further investigations are needed to show the physiological significance of changes we found.
This work was supported by APVV grant 0148-06 and VEGA grant 2/0133/08.

O54

Stress–Induced Changes in Gene Expression of Adrenergic Receptors in Rat Adipose Tissues

Vargovič P., Petrák J., Ukropec J., Kvetňanský R.
Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia
ueenvarg@savba.sk

Physiological and metabolic responses to sympathetic activation are mediated through catecholamines – noradrenaline (NA) and adrenaline (ADR) via adrenergic receptors (AR). Adipose tissues are one of the organs, which are innervated and regulated by the sympathetic system. According to localization, the adipose tissues are subdivided to (e.g.) mesenteric, subcutaneous, retroperitoneal, epididymal and brown adipose tissues. NA and ADR are released under stress and induce lipolysis via activation of the beta-AR. By contrast, activation of the alpha-AR results in an antilipolytic effect. The aim of this study was to measure gene expression of AR in mentioned five types of adipose tissues in rats exposed to immobilization stress. Our previous results have shown huge levels of NA and ADR in rat stressed by immobilization. We detected gene expression of the beta1-AR, beta2-AR, beta3-AR and alpha2A-AR, alpha2C-AR in all mentioned types of adipose tissue. Gene expression of alpha1-AR was not present. Immobilization stress decreased beta1-AR, beta3-AR and alpha2A-AR mRNA levels in mesenteric, epididymal and brown adipose tissues. Only small changes of beta-AR and alpha2-AR gene expression were observed in subcutaneous tissue and no changes were seen in retroperitoneal adipose tissue. Data obtained suggest different stress-induced regulation of AR gene expression in various adipose tissues. The found down-regulation of AR gene expression is most probably an effect of increased activity of sympathetic system under stress. Our results might help to understand the mechanism of stress-induced obesity. This work was supported by APVV grant 0148-06 and VEGA grant 2/0133/08.

Přednášky

O55
Editování mitochondriálních RNA v trypanosomách

Hashimi H., Čičová Z., Novotná L., Lukeš J.
Biologické centrum, Parazitologický ústav AVČR, and Fakulta přírodních věd, Jihočeská Univerzita, České Budějovice (Budweis)
jula@paru.cas..cz

RNA metabolismus trypanosom má řadu jedinečných vlastností, z nichž nejvýznamnější je editování RNA pomocí inzercí a delecí uridinů do mitochondriálních mRNA. Naše znalosti o mechanismu editování jsou poměrně detailní. Víme, že informace pro přesné vkládání a vyjímání uridinů je poskytována malými RNA molekulami označovanými jako guide RNA. Rovněž je podrobně prostudovaný proteinový komplex označovaný jako editosom, který se skládá z 20 podjednotek a zprostředkovává přenos informace z guide RNA do mRNA. V současnosti jsme se podíleli na charakterizaci proteinového komplexu MRP, který se rovněž podílí na editování tím, že působí jako tzv. „matchmaker“, neboli usnadňuje vazbu guide RNA na příslušné pre-editované mRNA. Patrně poslední proteinový komplex, jehož funkce je nezbytná pro editování RNA, což je životně důležitý proces pro trypanosomy a jim příbuzné parazity, je komplex označovaný MRB. Složení a základní charakterizace tohoto komplexu právě probíhá v naší laboratoři. Cílem přednášky bude posluchače seznámit se současným pohledem na editování RNA především u původce spavé nemoci Trypanosoma brucei a prezentovat výsledky, jichž jsme dosáhli při studiu MRP a MRB komplexů.

O56
Nový faktor v biogenezi savčí ATP syntézy

Čížková[1,2] A., Stránecký[1] V., Tesařová[3] M., Havlíčková[2] V., Paul[2] J., Ivánek[1] R., Hansíková[3] H., Kaplanová[2] V., Vrbacký[2] M., Hartmannová[1] H., Nosková[1] L., Honzík[3] T., Drahota[2] Z., Magner[3] M., Hejzlarová[2] K., Zeman[3] J., Houštěk[2] J., Kmoch[1]* S.
[1]Ústav dědičných metabolických poruch a [3]Klinika dětského a dorostového lékařství, 1.LFUK, Praha;
[2]Oddělení bioenergetiky, Fyziologický Ústav AVČR, Praha
sjkmoch@lf1.cuni.cz

Mitochondriální ATP syntáza (ATPáza) je klíčovým enzymem, který využívá energii substrátů oxidovaných respiračním řetězcem k přeměně ADP na ATP. Savčí ATPáza je 650 kDa proteinový komplex vnitřní mitochondriální membrány, který vzniká postupným spojováním 2 mitochondriálně a 14 nukleárně kodovaných strukturních podjednotek za účasti specifických nukleárně kodovaných asemblačních proteinů. Řada asemblačních proteinů byla popsána u kvasinek (např. ATP 10,11,12, 22, 23), ale jen tři jsou známy u savců (homology F1-specifických faktorů ATP11, ATP12 a homolog ATP23).
Izolované, nukleárně kodované defekty ATPázy (OMIM 604273) představují skupinu dědičně podmíněných onemocnění charakterizovaných neonatální laktátovou acidózou, 3-metylglutakonovou acidurií a hypertrofickou kardiomyopatií. Struktura a funkce ATPázy je v těchto případech normální, ale její množství a s ním i ATPázová aktivita a tvorba ATP jsou sníženy na <30%. Určení onemocnění podmiňujících genů v této skupině pacientů představuje jednu z cest k identifikaci a funkční charakterizaci doposud neznámých faktorů v biosyntéze savčí ATPázy.
Kombinací celogenomového homozygotního mapování (Affymetrix 250K arrays), studia expresních změn ve fibroblastových kulturách (Agilent 44k Arrays) a sekvenační analýzy v postižených rodinách jsme identifikovali u pacientů homozygotní mutaci c.317-2A>G lokalizovanou v sestřihovém místě intronu 2 genu TMEM70. Mutace způsobuje abnormální sestřih a degradaci transkriptu a vede k deficitu příslušného proteinového produktu TMEM70. Transfekce fibroblastových linií pacientů expresním vektorem obsahujícím TMEM70 vedla k obnovení biosyntézy plně metabolicky funkčního komplexu ATPázy. Fylogenetická analýza prokázala přítomnost homologů TMEM70 v genomech vyšších eukaryot a rostlin, ale ne v genomech kvasinek a hub.
Naše výsledky ukazují, že TMEM70 je nezbytným asemblačním proteinem savčí ATPázy a jeho mutace jsou častou příčinou izolovaného, nukleárně kodovaného defektu ATPázy u člověka.

O57
ATP-dependentní proteázy a biogeneze mitochondrií (ATP-dependent proteases and biogenesis of mitochondria)

Ondrovičová G., Bauer J., Kutejová E.
Department of Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovakia
evakutej@hotmail.com

ATP-dependent proteases – Lon protease and Clp protease localized in mitochondrial matrix and membrane AAA proteases: i-AAA proteases active in the intermembrane space and m-AAA proteases exposing catalytic sites to the matrix space – represent key components in mitochondrial proteolytic machinery. They are responsible for mitochondrial homeostasis and maintenance of integrity of mitochondrial DNA (mtDNA). Mitochondrial ATP-dependent proteases also participate in translation of mtDNA coded proteins and employ their chaperone function in membrane complex assembly. They accomplish protein quality surveillance and degrade non-assembled proteins to peptides. Lon protease is involved in response to oxidative, metabolic and ER stress. AAA proteases act as processing enzymes and mediate the maturation of some nuclear-encoded mitochondrial preproteins. The m-AAA protease controls ribosome assembly and protein synthesis within mitochondria. Independent of their proteolytic activity, AAA proteases mediate the membrane dislocation of substrate proteins.
Overproduction of the Lon protease was found in cancer cells, while down regulation has been connected with aging and later with necrosis. Yeast cells lacking both m- and i-AAA proteases are not viable. Inactivation of only the m-AAA protease has lead to the loss of assembled respiratory complexes in the inner membrane. Deletion of i-AAA protease YME1, on the other hand, has resulted in pleiotropic growth defects and the accumulation of punctuate mitochondria. Loss of function mutations in paraplegin are causative for an autosomal recessive form of hereditary spastic paraplegia (HSP), a neurodegenerative disorder characterized by progressive axonal degeneration in the cortical spinal tract.
References:
ATP-depenent proteases, review book in press, Research Singpost, 2008
Acknowledgement. This study was supported by grants from the Slovak Grant Agency VEGA 2/0141/08 and the Science and Technology Assistance Agency APVV-0024-07.

O58
Biogeneze savčí cytochrom c oxidázy

Stibůrek L.
Mitochondriální laboratoř, 1. Lékařská fakulta UK
lstib@lf1.cuni.cz

Savčí cytochrom c oxidáza (CcO) je heterooligomerní transmembránový komplex vnitřní mitochondriální membrány, náležející do nadrodiny hem-měď obsahujících terminálních oxidáz. Jako terminální enzym mitochondriálního elektron-transportního respiračního řetězce katalyzuje přenos elektronů z redukovaného cytochromu c na molekulární kyslík, spojujíce tuto reakci s přenosem protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Savčí CcO se skládá z třinácti polypeptidových podjednotek kódovaných zčásti na mitochondriální a zčásti na jaderné DNA, a z několika funkčně i strukturně významných prostetických skupin. Biogeneze savčího komplexu je komplikovaný, tkáňově-specifický proces, zahrnující koordinovanou expresi mitochondriálně a jaderně kódovaných podjednotek, jejich import do mitochondrie, inzerci do vnitřní membrány a asemblaci do funkčního celku, a v neposlední řadě pak současnou syntézu/import a inkorporaci prostetických skupin. Jednotlivé kroky tohoto procesu jsou zajišťovány specializovanými proteinovými faktory identifikovanými u savců především na základě různého stupně sekvenční homologie s kvasinkovými protějšky. Molekulární funkce těchto tzv. asemblačních faktorů v biogenezi savčí CcO začíná být detailněji popisována až v poslední letech. S úspěchem je při tom využíváno jednak buněčných linií od pacientů s mutacemi v genech kódujících některé z těchto faktorů, a především v poslední době také technologií genového knock-outu a RNA interference. I přes značnou strukturní a funkční konzervaci mitochondriálních CcO se ukazuje, že některé kroky biogeneze tohoto enzymového komplexu probíhají u nižších a vyšších eukaryot do značné míry odlišně.

O59

Zmeny v ATP syntetizujúcom systéme u mutantov *ethanothermobacter thermautotrophicus* rezistentných k inhibítorom syntézy ATP

Šmigáň P., Majerník A., Nováková Z.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV v Ivanke pri Dunaji
peter.smigan@savba.sk

Methanoarchaea , najstriktnejšie anaeróby na Zemi, patria do skupiny mikroorganizmov obsahujúcich dva H+ a Na+ cykly, ktoré sú zložené z ΔμH+ a ΔμNa+ generátorov a ΔμH+ a ΔμNa+ konzumentov. Koexistencia týchto ΔμH+ a ΔμNa+ generátorov a ΔμH+ a ΔμNa+ konzumentov u methanoarchaea indukovala zásadnú otázku : aká je ich fyziologická funkcia v bunkovej energetike? Inhibičné experimenty indikujú, že oba elektrochemické gradienty sa priamo zúčastňujú na syntéze bunkového ATP prostredníctvom dvoch rozdielnych ATPáz/syntáz . Aby sme prispeli k riešeniu tejto komplexnej bioenergetickej otázke v roku 1997 sme navrhli projekt využitia biochemických mutantov rezistentných k relevantným inhibítorom pri štúdiu konzervácie energie u methanoarchaea. Predpokladali sme ,že takýto prístup by pomohol prispieť k riešeniu komplexity energiu konzervujúceho systému u methanoarchaea. V našej práci sa zaoberáme izoláciou a charakterizáciou nových biochemických mutantov M.thermautotrophicus rezistentných k N,N´-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) a tributylcínu, ktoré inhibujú u methanoarchaea syntézu ATP. Biochemická a molekulárna charakterizácia uvedených mutantov naznačuje, že u buniek M.thermautotrophicus existuje mechanizmus ,ktorý prepája syntézu ATP poháňanú ΔH+ na syntézu ATP poháňanú ΔNa+ a naopak v závislosti na energii ΔμH+ a ΔμNa+ .Tento mechanizmus je pravdepodobne vitálne dôležitý pre methanoarchaea , ktoré žijú blízko termodynamického limitu.

Tento vedecký projekt bol podporený grantom č. APVT-51-024904 a VEGA 2/6025/27.

O60

Vliv mitochondriálního genomu na rizikové faktory diabetu 2. typu

Pravenec M., Houštěk J., Kazdová L., Kurtz T. W.
Fyziologický ústav AV ČR, Praha; IKEM, Praha; Kalifornská univerzita, San Francisko
pravenec@biomed.cas.cz

Byla publikovaná řada studií o možné úloze variant mitochondriální DNA (mtDNA) v patogenezi metabolického syndromu a diabetu 2. typu. Jednoznačné zjištění úlohy mtDNA však není možné vzhledem k nedefinované variabilitě jaderného genomu, imprintingu a faktorů prostředí. Nahrazení různých mitochondriálních genomů na identickém genetickém pozadí konplastických kmenů představuje způsob, jak jednoznačně izolovat účinky mitochondriálního genomu na komplexní znaky. V této studii jsme analyzovali SHR a SHR-mt(BN) konplastické kmeny s identickým jaderným genomem spontánně hypertenzních potkanů kmene SHR, ale s rozdílnými mitochodriálními genomy, z kmene SHR nebo Brown Norway (BN), které kódují rozdílné aminokyseliny v 7 proteinech oxidativní fosforylace, včetně unikátní mutace v podjednotce 1 mitochondriální cytochrom c oxidázy (mt-Co1). Ve srovnání s kmenem SHR konplastický kmen vykazoval zhoršenou toleranci ke glukóze a snížené hladiny glykogenu a ATP ve svalech, jakož i redukovanou aktivitu a množství cytochrom c oxidázy v jaterních mitochondriích. Tyto výsledky 1) poskytly první přímé důkazy pro asociaci přirozeně se vyskytujících variant v mtDNA s rizikovými faktory pro diabetes 2. typu a 2) prokázaly, že spontánní variabilita v mitochondriálním genomu může sama o sobě podmiňovat systémové metabolické poruchy.

O61
Úloha mitochondrií v programu buněčné smrti

Polčic P., Drobcová B., Kiššová I., Mentel M., Kolarov J.
Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic
polcic@fns.uniba.sk

In the initiation phase of apoptosis in mammalian cells, several proteins – including cytochrome c, apoptosis induction factor (AIF) and several others – are released from mitochondria into cytosol in response to various apoptotic stimuli. Once in the cytosol, they activate the pathway of apoptotic self-destruction. Permeabilization of mitochondrial membranes for these proteins is considered a commitment point of apoptotic pathway and is governed by proteins of the Bcl-2 family. While Bcl-2 protein family includes pro-apoptotic members – Bax and Bak, which mediate the release of cytochrome c from mitochondria to the cytosol, other members – e.g. Bcl-2 and Bcl-XL – inhibit their action to promote cell survival. Balanced activity of pro- and anti-apoptotic family members ensures the cell survival in the absence of apoptotic stimuli. The subset of Bcl-2 family referred to as 'BH3-only' proteins constitutes an actual life/death switch. These proteins monitor a wide range of different insults and pro-death signals and in response to them activate Bax and Bak by mechanism that is still under dispute.
We have been using yeast Saccharomyces cerevisiae as a model system, in which to study the mutual interactions of Bcl-2 proteins and interactions of Bcl-2 proteins with mitochondrial membranes. Although yeast do not have homologues of Bcl-2 family genes in their genome, ectopicaly expressed mammalian Bcl-2 family members do function in yeast and induce the permeabilization of mitochondrial membranes as they do in mammalian cells.
The overview of the recent understanding of the role of mitochondria and Bcl-2 proteins, as well as recent results from our studies in yeast will be presented.
This work was supported by Science and Technology Assistance Agency under the contract No. APVT-20-012404 and by VEGA under the contract No. 1/0264/08.

O62
Svalová netřesová termogeneze u myší indukovaná vysokotukovou dietou, význam v rezistenci k obezitě

Kůs V., Pražák T., Brauner P., Hensler M., Kuda O., Flachs P., Janovská P., Medříková D., Rossmeisl M., Jílková Z., Štefl B., Drahota Z., Houštěk J., Kopecký J.
Fyziologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha
kus@biomed.cas.cz

Vysokotuková (HF) dieta má výrazný obezitogenní účinek, tento efekt může být zvrácen zvýšením energetického výdeje. Cílem studie bylo popsat mechanizmus aktivace netřesové termogeneze ve svalu vlivem HF diety a její možné přispění k odolnosti ke vzniku obezity. Dále prokázat zahrnutí hormonu produkovaném tukovou tkání, leptinu, a enzymu AMP-aktivované proteinové kinázy (AMPK) v její regulaci. Byly použity 2 myší linie lišící se v náchylnosti ke vzniku obezity, rezistentní myší linie A/J a k obezitě náchylná C57BL/6J (B/6J). Významnou odlišností ve fenotypu linií je indukce produkce leptinu v reakci na HF dietu. Experimenty byly prováděny na samcích chovaných ve 30 °C, z důvodů eliminace chladového stresu. Ve věku 4 týdnů byly odstaveny na dietu s nízkým obsahem tuku (LF) nebo na HF dietu. Po 2 týdnech byly použity k experimentům a byly odebrány tkáně pro in-vitro pokusy a další analýzy. U myší linie A/J HF dieta zvýšila metabolický obrat, v oxidativním typu svalu m. soleus fosforylaci i celkový obsah AMPK a zvýšenou oxidaci mastných kyselin. Posun oxidace substrátu ze sacharidů na lipidy potvrzují i data z genové exprese. U myší linie B6 se výsledky v závilosti na dietě neliší. Výsledky naznačují význam svalové netřesové termogeneze a oxidace lipidů ve fenotypu k obezitě rezistentní myší linie A/J a ukazují jejich shcopnost reagovat na HF dietu změnami v metabolizmu oxidativního svalu, pravděpodobně cestou přes leptin a AMPK.

O63
Glycerol-3-fosfátem indukovaná produkce reaktivních forem kyslíku v savčích mitochondriích

Vrbacký M., Drahota Z., Mráček T., Pecinová A., Houštěk J.
Oddělení bioenergetiky, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 14220 Praha 4
vrbacky@biomed.cas.cz

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) při oxidaci glycerol-3-fosfátu byla v poslední době pozorována v mnoha systémech. Zde ukazujeme, že savčí mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (mGPDH, EC 1.1.99.5) představuje významné místo mitochondriálního respiračního řetězce kde dochází k tvorbě ROS. S pomocí ROS-sensitivních fluorescenčních prób v přítomnosti specifických inhibitorů respiračního řetězce antimycinu A a myxothiazolu jsme určili množství ROS, které pocházejí přímo z mGPDH a koenzymu Q versus ROS, které jsou produkovány komplexem III. Při porovnání se sukcinátem, ROS produkce závislá na glycerol-3-fosfátu v mitochondriích hnědého tuku vykázala cca. 3x vyšší příspěvek dehydrogenázy a koenzymu Q versus komplex III. Podobně jako spektrofluorometrie, také KCN-insensitivní spotřeba kyslíku aktivovaná jednoelektronovým akceptorem ferrikyanidem prokázala vysokou mGPDH-dependentní ROS produkci. Stanovení hladiny ROS bylo dále provedeno v mitochondriích z jater, srdce a mozku, tj. z tkání, které narozdíl od hnědého tuku obsahují velmi malé množství mGPDH (tzv. "mGPDH-poor" tkáně). Překvapivě bylo nalezeno, že glycerol-3-fosfát dependentní tvorba ROS na úrovni mGPDH a koenzymu Q vztažená na aktivitu dehydrogenázy vykazuje v těchto tkáních 39x, 28x a 3x vyšší produkci ROS ve srovnání se sukcinát dependentní produkcí. Naše výsledky tak ukazují nejen schopnost mGPDH generovat ROS, ale také vysokou efektivitu savčích mitochondrií s nízkým obsahem mGPDH produkovat ROS za přítomnosti glycerol-3-fosfátu.

O64
Regulace mitofagie v kvasinkách (Regulation of mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*)

Kiššová I., Deffieu M., Salin B., Manon S., Camougrand N.
Department of Biochemistry, Comenius University, Bratislava, Slovak republic and IBGC CNRS Université Bordeaux 2, France
kissova@fns.uniba.sk

Autophagy is a general intracellular-degradation process that plays a crucial role in the survival against nitrogen starvation in yeast, cultured animal cells as well as whole animals. This process involves the formation of double-membraned vesicles named autophagosomes that engulf and deliver cytosolic material to vacuoles. Autophagy is generally considered to be a non-selective process. However, selective forms of it have been shown to be involved in the degradation of organelles such as peroxisomes. Although the case for selective autophagic degradation of mitochondria has not been proven, it has been suggested that a hypothetical instance of this process (selective degradation of altered mitochondria) can have a significant impact on cell physiology. Our study using lactate-grown yeast cells subject to nitrogen-starvation has provided evidence for an early process of selective targeting of mitochondria and for a late process of classical non-selective microautophagy (including that of mitochondria). The early phenomenon was absent from a mutant inactivated for the gene UTH1 while non-selective autophagy was not altered. These data suggest that mitochondria autophagy occurred through two distinct pathways, the earlier being selective (mitophagy) and involving the product of UTH1 (an outer-mitochondrial-membrane protein).
The possible mitochondrial signals involved in regulating mitophagy will be discussed.
This work was supported by Science and Technology Assistance Agency under the contract No. APVT-20-012404 and by VEGA under the contract No. 1/0264/08.

Postery

P128
Characterization of mitochondrial carriers from Candida parapsilosis

Zeman I., Jánošíková E., Nosek J.
Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovakia.
izeman@fns.uniba.sk

Mitochondrial carriers play important role in the metabolism of eukaryotic cell as they interconnect biochemical reactions in cytosol and mitochondria. These structurally related proteins transport variety of metabolites across the inner mitochondrial membrane including nucleotides, amino acids, cofactors, carboxylic acids, and inorganic ions. Transported molecules are required for Krebs cycle, oxidative phosphorylation, synthesis and degradation of proteins, nucleic acids, amino acids, and fatty acids. Saccharomyces cerevisiae encodes 35 members of mitochondrial carrier family (MCF) and majority of carriers have been characterized by transport assays. Little is known about MCF proteins from other yeast species which are evolutionary distant from S. cerevisiae.
Comparative and evolutionary genomics provides a suitable platform for functional analysis of the MCF proteins. In this study, we investigated genes coding for MCF proteins present in the genome of the pathogenic, strictly aerobic yeast, Candida parapsilosis. This species exhibits several interesting physiological features such as the presence of antimycin A-insensitive but bongkrekate-sensitive oxidative pathway, functional phosphorylation site I and the presence of linear DNA genome in mitochondria. Yet only one MCF protein, the mitochondrial ADP/ATP carrier, was isolated and functionally characterized. To identify the complete set mitochondrial carriers, we have searched unannotated genome sequence of this species for genes encoding the homologs of all 35 MCF members known from S. cerevisiae. The identity of sequences was verified by comparison with MCF from both S. cerevisiae and Candida albicans. Subsequently, we initiated experimental analysis of selected C. parapsilosis MCF homologs. For example, the gene encoding putative carrier involved in Krebs cycle, CpSFC1, was amplified and cloned into yeast expression vectors with the aim to identify its function using a heterologous system S. cerevisiae.

P129
Polarographic evaluation of mitochondrial functions in permeabilized muscle cells in patients with suspected mitochondrial defects

Wenchich L., Hansíková H., Knoppová S., Zeman J.
Department of Paediatrics, Charles University, 1st Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic
laszlo.wenchich@vfn.cz

Analysis of mitochondrial function has become central to the study of intracellular energy metabolism and the diagnosis of many diseases. In diagnostics, comparison of various methods is mostly necessary for the precise assessment of the biochemical defect.
The aim of our study was to compare the results from polarographic analyses in saponin permeabilised muscle fibres with the spectrophotometric analyses of respiratory chain complexes in isolated muscle mitochondria in 210 patients with various muscle diseases recommended to muscle biopsy.
The activities of respiratory chain complexes I, II, III and IV and citrate synthase were measured spectrophotometrically in isolated muscle mitochondria. Polarographic studies were performed on permeabilized muscle fibres using multi substrate- inhibitor titration.
Decreased activity of one or more respiratory chain complexes were found in 110 patients using spectrophotometric methods and decreased oxygen consumption after one or more substrates were observed in 105. The results of both methods (positive or negative) were in concordance in 152 patients (72%). Discrepancies in methods (28% of patients) were observed not only in patients with various muscle dystrophies with or without secondary mitochondrial disturbances but also in patients with classical mitochondrial disorders due to known mutations.
Comparison of the two methods showed several differences in evaluation of mitochondrial enzymes activity due to the fact that both methods used different conditions for enzyme activity measurements. In contrast to oxygen consumption measurements, where the function of the whole-integrated respiratory chain is characterized, spectrophotometric measurements characterize activities of isolated complexes in disintegrated membranes. However, we may conclude from our experiments, that both methods provide useful and complementary data about mitochondrial energetic function.
Supported by grant CAG 1M683 780 5002.

P130
Vplyv niektorých statínov a antimykotík na Methanothermobacter thermautotrophicus

Řezníčková J., Nováková Z., Majerník A., Šmigáň P.
Ústav biochemia a genetiky živočíchov SAV, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko
alan.majernik@savba.sk

Methanoarchaea sú prirodzenou súčasťou črevnej mikroflóry v tráviacom trakte živočíchov od termitov až po človeka. V súčasnosti máme však iba veľmi obmedzené vedomosti o význame týchto mikroorganizmov v procesoch trávenia, ako aj o ich interakciách s bežne podávanými terapeutikami, prípadne ich o úlohe pri šírení rezistencie voči antimikrobiálnym látkam. Methanothermobacter thermautotrophicus kmeň Delta H je častým modelovým metanogénom pre j relatívne jednoduché možnosti jeho kultivácie za laboratórnych podmienok, ale predovšetkým aj pre to, že je to kmeň geneticky veľmi blízky ku Methanosphaera stadmanae a Methanobrevibacter smithii, dvom metanogénom prirodzene obývajúcim ľudský tráviaci trakt.
V predkladanej štúdii sme použili M. thermautotrophicus na zistenie účinku niektorých bežných terapeutík ako sú statíny (pravastatín a lovastatín) a antimykotiká (terbinafín a amfotericín). Kým obe spomenuté antimykotiká nepreukázali žiaden výrazný efekt na rast a tvorbu metánu M. thermautotrophicus, efekt statínov bol úplne odlišný. Lovasatín aj pravastatín mali výrazne inhibičný vplyv na rast metanogénov a podobne inhibovali aj tvorbu metánu za rastových podmienok. Na druhej strane sa tieto statíny výrazne líšili svojim efektom ne metanogenézu za nerastových podmienok. Bunky kultivované 24 hodín v prítomnosti pravastatínu mali zníženú tvorbu metánu aj po odmytí tohto inhibítora. U lovastatínu sme takýto účinok nepozorovali.
Naše doterajšie výsledky naznačujú, že niektoré bežne používané statíny môžu byť toxické voči mikroorganizmom prirodzenej črevnej mikroflóry a navyše, pravastatínová inhibícia mevalonátovej dráhy tvorby izoprenoidov u M. thermautotrophicus môže mať priamy vplyv aj na tvorbu metánu.
Tento projekt bol podporený grantami APVV-0760-07 a VEGA 2/C025/26.

P131
The mitochondrial lon protease as DNA binding protein

Ondrovičová G., Fričová D., Hlinková V., Ambro Ľ., Adamušková H., Kutejová E., Nosek J.
1 Department of Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovakia; 2 Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovakia
evakutej@hotmail.com

Lon protease in eukaryotes is localized in mitochondrial matrix and plays a crucial role in the organelle biogenesis. This ATP-dependent protease participates in degradation of misfolded, misassemled and oxidatively damaged proteins. In addition, it is implicated in the maintenance of mitochondrial genome and expression of mitochondrial genes. Mammalian Lon protease interacts with components of the mitochondrial replisome (POLG and Twinkle) and binds single-stranded G-rich sequences in DNA and RNA molecules in vitro as well as the mitochondrial DNA (mtDNA) in vivo. Yeast cells lacking the Lon protease exhibit growth defect in media with non-fermentable carbon source and are unable to maintain mtDNA. It is presumed that Lon protease provides a link between protein- and mtDNA-quality control.
To investigate biological role(s) of Lon-mtDNA interactions, we identified and cloned the gene CpLON1 encoding the Lon homolog from the yeast Candida parapsilosis. This microorganism represents a unique model system for the study of mtDNA dynamics, as, in contrast to baker's yeast, its mitochondria contain two types of replicons, the linear mitochondrial genome terminating with telomeric tandem arrays and series of extragenomic telomeric circles (t-circles) derived from the mitochondrial telomere. As C. parapsilosis utilizes alternative version of the genetic code, we constructed recoded allele CpLON1R, in which 'CTG' codons were replaced by 'TCG' triplets. This allele can be expressed in heterologous hosts such as Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli. Our subsequent experiments were aimed at functional analysis of CpLON1.
Acknowledgements. Our work was supported by grants APVV 0024-07, APVV LPP-0164-06, VEGA 2/0141/08.

References:
1. Liu, T., et al., J. Biol.Chem. 279, 13902 (2004)
2. Lu B., et al., J. Biol. Chem. 282, 17363 (2007)
3. Nosek J., et al., Mol Genet Genomics 272, 173 (2004)

P132
Štúdium bioenergetických mutantov methanoarchaea kombináciou genomického, proteomického a sekvenačného prístupu

Majerník A., Nováková Z., Šurín S., Šmigáň P.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko
alan.majernik@savba.sk

Methanoarchaea patria globálne dôležité mikroorganizmy. Ich jedinou energetickou metabolickou dráhou je metanogenéza. Zaujímavé je, že počas metanogenézy dochádza k tvorbe dvoch primárnych elektrochemických gradientov, a to protónov ako aj sodných iónov. Prepojenie týchto gradientov na membráne je sprostredkované Na+/H+ antiporterom. Ukázalo sa, že oba gradienty sú schopné priamo poháňať tvorbu ATP prostredníctvom ATP syntázového komplexu. Ako účinný nástroj na zjednodušenie tejto komplikovanej bioenergetickej situácie sa osvedčil genetický prístup. V našom laboratóriu sa podarilo cielene pripraviť niekoľko mutantov, rezistentných voči terapeutikám s léziou na niektorom z kritických krokov tvorby a premeny energie.
V súčasnosti nám kombinácia genomického, proteomického a sekvenačného prístupu otvára možnosti reálneho skúmania bioenergetiky methanoarchaea. Pri identifikácia génov kódujúcich hlavné komponenty bioenergetickej mašinérie u M. thermautotrophicus sme dospeli k prekvapivým zisteniam. Genóm tohto organizmu kóduje iba A typ ATP syntázy, hoci biochemické výsledky naznačujú prítomnosť dvoch nezávislých ATP syntetizujúcich komplexov. Podobne, v genóme sa nenachádza žiaden jasný homológ génov kódujúcich Na+/H+ antiporter, hoci jeho aktivita bola na membránach jednoznačne biochemicky charakterizovaná. Zatiaľ sa nám podarilo identifikovať niekoľko génov membránových transportérov, ktoré by mohli mať takúto aktivitu. Experimentálne prístupy charakterizujúce zmeny v proteóme divého kmeňa a pripravených mutantov nás následne orientujú na identifikáciu rozdielne prítomných proteínových komplexov, vyvolaných buď priamo mutáciou alebo adaptáciou na bioenergetickú poruchu. Vytypované gény a operóny sú následne sekvenované a porovnávané medzi divým kmeňom a mutantami. Práve takáto kombinácia prístupov je nevyhnutná na pochopenie unikátnej bioenergetickej situácie na membránach metanoarchaea.
Tento projekt bol podporený grantami APVV-0760-07 a VEGA 2/C025/26

P133
Mechanisms of resistance to pharmaceutical drugs and biocides in Methanothermobacter thermautotrophicus

Nováková Z., Majerník A., Šmigáň P.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Moyzesova 61, 90028 Ivanka pri Dunaji, Slovensko
zuzana.novakova@savba.sk

Methanosphaera stadmanae and Methanobrevibacter smithii belong to group of methanoarchaea, which are spread in anaerobic environment including guts of animals. These ones are the most common human methanogenic commensals with different distribution in human population. Their role in the human digestive tract and their potential for the generation and dispersal of drug resistance are only poorly understood.
Our group study Methanothermobacter thermautotrophicus strain Delta H, which is a close relative of the above methanoarchaea present in human gut and can serve as a model organism for its relatively easy cultivation. We have used these strain to screen for biochemical mutants resistant to different pharmaceutical drugs such as the antibiotic neomycin, the potassium-retaining diuretic amiloride, the biocides tetrachlorsalicylanilide (TCS) and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) and we have isolated and partly characterised all of them recently. All these mutant strains exhibited besides other lesions, modifications either in ATPase activity or ATP synthesis. Indeed, ATP synthesis in whole cells of neomycin and DCCD resistant mutants was changed as compared to that of the wild type. Moreover, our protein analysis indicated that at least some subunits of the A0A1 ATPase were present in different amounts in the resistant mutants and the wild type. Therefore, we focused our attempts to identify mutations causing the resistances to DNA locus coding A0A1 ATP synthase. Chromosomal locus of A1A0 ATP synthase from resistant mutants was amplified by PCR, sequenced and compared among wild type and mutant strains.
Our results revealed several mutations presented in the operon and their potential relevance to ATPase functions is currently being evaluated.
This work was supported by the research grants APVV-0760-07 and VEGA 2/C025/26.

P134
Charakterizace respiračních superkomplexů v různých typech savčích mitochondrií

Kovářová N., Pecina P., Dell'Agnello C., Zeviani M., Houštěk J.
Fyziologický ústav AVČR, Praha; 2Národní Neurologický Institut, Ústav molekulární neurogenetiky, Miláno, Itálie
nikola.kov@centrum.cz

Komplexy respiračního řetězce tvoří strukturně a funkčně složitější jednotky zvané superkomplexy. V savčích mitochondriích jsou superkomplexy složeny z komplexu I, III a IV. Naším cílem bylo zjistit jak změny v buněčném obsahu cytochrom c oxidasy (COX) ovliv|ňují složení a výskyt superkomplexů v mitochondriích izolovaných z různých tkání. Pro studium jsme využili myší model isolovaného defektu COX na podkladě nock-outu Surf1 asemblačního proteinu. Pro srovnání jsme analyzovali superkomplexy v mitochondriích z COX-defektních lidských fibroblastů od pacientů se SURF1 mutací. Pro studii jsme použili 1D a 2D elektroforetické metody v kombinaci s western blot imunodetekcí specifickými protilátkami proti podjednotkám komplexů I, III a IV.
Zjistili jsme, že mitochondrie z jaterní, mozkové, srdeční a svalové tkáně kontrolních i COX-defektních myší obsahují jen dva typy superkompelxů, I-III2 a III2-IV. V myších fibroblastech byl navíc detekován I-III2-IV superkomplex, stejné složení superkomplexů měly i lidské fibroblasty. Přitom veškeré množství komplexu I bylo v lidských fibroblastech ve formě I-III2-IV superkomplexu. Snížené množství COX v mitochondriích s COX-defektem, u myší i u člověka, mělo výrazný vliv na množství COX-superkomplexů, ale množství komplexů I a III v superkomplexech bylo srovnatelné s kontrolou. Naše výsledky prokazují specifické tkáňové a druhové rozdíly ve složení a výskytu superkomplexů v savčích mitochondriích.

P135
Heteroplazmie mutace 9205delTA v ATP6 genu mitochondriální DNA a porucha funkce mitochondriální ATP syntézy

Hejzlarová K., Ješina P., Kaplanová V., Drahota Z., Kalous M., Houštěk J.
Fyziologický ústav AVČR, Praha; Pediatrická klinika 1.LF UK, Praha
katerina.hejzlarova@biomed.cas.cz
1) Fyziologický ústav AVČR, Praha
2) Pediatrická klinika 1.LF UK, Praha
** katerina.hejzlarova@biomed.cas.cz*

Poruchy ATP syntázy na podkladě mutací v mtDNA ATP6 genu pro podjednotku Fo-a vedou k těžké mitochondriální encefalopatii u dětí. Vedle záměnných mutací byla nalezena i 9205delTA mikrodelece, postihující maturaci ATP6/COX3 mRNA. Jsou známy pouze dva případy této mutace s velmi odlišnými fenotypy. Původně byly oba popsány jako homoplazmická mutace, ale naše analýza fibroblastů odhalila heteroplazmii u pacienta s mírným postižením. Abychom mohli studovat vztah mezi množstvím mutované mtDNA, obsahem podjednotky Fo-a a funkcí ATP syntázy, připravili jsme transmitochondriální cybridy s heteroplazmií mutace v rozmezí 50-100 %.
Zjistili jsme, že pokles v obsahu Fo-a vzhledem k ostatním podjednotkám ATP syntázy (SDS-PAGE/Western blot), snížení mitochondriální tvorby ATP (luciferázová esej) stejně jako pokles v ADP-stimulované respiraci závisí na vzrůstajícím množství mutované mtDNA a vykazují prahový efekt – mutace se významně projeví až když její podíl vzroste nad 80 %. Přitom vztah mezi funkčními projevy a obsahem podjednotky Fo-a je lineární.
Z našich výsledků vyplývá, že fenotyp dysfunkce ATP syntázy závisí na heteroplazmii 9205delTA mutace a vliv mutace na ATP produkci a ADP-stimulovanou respiraci koreluje se ztrátou podjednotky Fo-a. Snížení respirace se přitom projevuje při nižších hladinách mutované mtDNA, pravděpodobně v souvislosti s poklesem v obsahu podjednotky COX3. Prahový efekt je tak obdobný u ATP6 mutací postihujících množství nebo AMK složení Fo-a proteinu.

P136
Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by pyruvate (Obnova aktivity cytochrom c oxidázy inhibované kyanidem prostřednictvím pyruvátu)

Nůsková H., Pecina P., Drahota Z., Houštěk J.
Oddělení Bioenergetiky, Fyziologický ústav AV ČR, Praha
nuskova@biomed.cas.cz

Aktivita terminálního enzymu dýchacího řetězce cytochrom c oxidázy (COX) je inhibována kyanidem. Tato inhibice je reverzibilní při podání 2-oxokyselin, které s kyanidem reagují za vzniku kyanohydrinů.
Na mitochondriích izolovaných z jater potkana jsme se pokusili získat další informace o obnově aktivity COX inhibované KCN prostřednictvím pyruvátu. Pomocí oxygrafu OROBOROS jsme vyšetřovali rychlost respirace závislé jak na sukcinátu, tak na askorbátu + TMPD. Sukcinátovou respiraci inhibovanou kyanidem o koncentraci 0,25 mM, který kompletně inhibuje aktivitu COX, lze pyruvátem obnovit na 100 % původní hodnoty. Zato vlastní aktivita COX vyjádřená jako respirace závislá na askorbátu + TMPD je obnovitelná maximálně na 40 % původní aktivity. Tyto hodnoty odpovídají tomu, že COX je v nadbytku nad ostatními enzymy dýchacího řetězce a inhibice COX se neprojeví snížením rychlosti sukcinátové respirace, pokud COX není inhibována více než ze 70 %. 40% obnova aktivity COX tedy plně dostačuje k úplné obnově rychlosti sukcinátové respirace.
Dále jsme vyloučili vliv koncentrace kyslíku na účinnost zvratu kyanidové inhibice COX pyruvátem. Stanovením p50 (tj. parciálního tlaku kyslíku, při němž je aktivita COX 50% vzhledem k maximální aktivitě) na sukcinátové respiraci jsme ukázali, že vazba kyanidu ovlivňuje enzymatickou kinetiku COX. Po částečné obnově aktivity COX pyruvátem byla hodnota p50 zvýšena až desetinásobně.

P137
Genetický původ a komplementační studie izolovaného defektu mitochondriální ATP syntézy

Havlíčková V., Čížková A., Paul J., Kaplanová V., Tesařová M., Zeman J., Kmoch S.
Fyziologický ústav, AVČR v.v.i., Ústav dědičných a metabolických poruch a Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta, UK.
vendyh@biomed.cas

Dysfunkce ATP syntázy vede k závažným metabolickým poruchám zejména u dětí. Může být způsobena mutacemi v mtDNA, postihující obě mitochondriálně syntetizované podjednotky ATP6 a ATP8, nebo v jaderném genomu. V poslední době byla diagnostikována řada pacientů s ATP syntázovým defektem jaderného původu, ale jen v jednom případě byla nalezena mutace, která postihuje asemblační faktor ATP12. Studium ostatních případů vyloučilo i postižení genů pro podjednotky enzymu. Následná analýza genové exprese a celogenomové mapování homozigozity identifikovaly mutaci v genu pro suspektní mitochondriálním protein o 30 kDa (TMEM70). Mutace byla nalezena u 25 homozygotních pacientů a nebyla přítomná u kontrol.
Cílem studie bylo prokázat, zda wtTMEM70 může komplementovat ATP syntázový defekt ve fibroblastech pacientů. Defektní buněčné linie byly transfekovány vektorem pEF-DEST51 obsahující wtTMEM70 gen a obsah ATPázy a její složení byly analyzovány v mitochondriích izolovaných metodou hypotonického šoku. SDS-PAGE a WB prokázaly u transfekovaných buněk výrazný nárůst podjednotek ATP syntázy a Blue-Native-PAGE a WB ukázaly, že wtTMEM70 normalizuje mitochondriální obsah plně asemblovaného ATPázového komplexu o velikosti 620 kDa. Efekt komplementace byl dále potvrzen imunoflorescenční analýzou fibroblastů s použitím specifických protilátek. Paralelní funkční studie v naší laboratoři prokázaly, že mutace v TMEM70 je zodpovědná za izolovanou deficienci ATPázy.

Přednášky

O65
Sekvenční a integrované chemoenzymové reakce: Nové trendy v aplikaci biokatalýzy

Martínková L., Křen V.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Cetrum biokatalýzy a biotransformací
martinko@biomed.cas.cz

Obor biokatalýzy a biotransformací zaznamenal v poslední době rychlý rozvoj, a to v oblasti základního enzymologického výzkumu i v oblasti technických aplikací enzymů (využití nových technik imobilizace a stabilizace enzymů, enzymové katalýzy v nevodných systémech, vývoji membránových reaktorů aj.). Tyto nové směry byly posíleny požadavky chemického a farmaceutického průmyslu na selektivní biokatalyzátory s vysokou účinností, stabilitou, regioselektivitou a především stereoselektivitou.
Současným trendem je zejména integrace dvou nebo více enzymových nebo enzymových a chemických reakcí. Tyto sekvenční (chemo)enzymové postupy umožňují např. integraci přeměny substrátu s jeho racemizací nebo s regenerací kofaktoru in situ, odstraňují nutnost isolovat reakční meziprodukty, zvyšují čistotu produktu a celkovou účinnost procesu.
Využití moderních postupů v biokatalýze bude ilustrováno zejména příklady z výzkumu nitrilas (screening nových enzymů [1], nové postupy imobilizace jako zesítění enzymových agregátů, „cross-linked enzyme aggregates"- CLEAs" [2], integrace enzymové hydrolýzy nitrilu s enzymovou hydrolýzou vedlejšího produktu amidu [3] nebo aplikace nitrilas v membránových reaktorech [1]).
Financováno granty LC06010 (MŠMT) a IAA500200708 (GA AV ČR).

[1] V.Vejvoda, V. Křen, L. Martínková et al., J. Mol. Catal. B-Enzym. 50 (2008) 99.
[2] C. Mateo, R.A. Sheldon et al., Biotechnol. Bioeng. 86 (2004) 273.
[3] V.Vejvoda, V. Křen, L. Martínková et al., Biocatal. Biotrans. 24 (2006) 414.

O66
Vítěz ceny J. V. Koštíře (Zbyněk Prokop): Inženýrství stereoselektivity enzymů pro aplikace biokatalýzy

Prokop Z., Pavlová M., Koudeláková T., Klvaňa M., Mozga T., Chaloupková R., Damborský J.
Loschmidtovy laboratoře, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
zbynek@chemi.muni.cz

Enzymy jsou tradičně a v posledních letech stále intenzivněji využívány jako přírodní biokatalyzátory při výrobě potravin, čistých chemikálií a farmaceutik. Jejich využití v chemické reakci umožňuje vysokou účinnost a selektivitu. Biokatalýza rovněž dobře splňuje kritéria trvale udržitelné technologie: enzymy jako přírodní katalyzátory nejsou toxické, nevyžadují extrémní reakční podmínky, snižují energetickou náročnost procesů, jsou získávány z biomasy jako obnovitelného zdroje a po jejich použití jsou snadno a zcela biologicky rozložitelné. Nevýhodou některých přírodních enzymů je nízká stabilita, úzká substrátová specifita nebo náchylnost k inhibicím, které často limitují možnosti jejich širokého využití.
Rychlý rozvoj technik a znalostí molekulární biologie a biochemie v posledním desetiletí umožňuje využít sofistikované přístupy enzymového inženýrství k překonání zmíněných limitací. V přednášce budou představeny moderní přístupy enzymového inženýrství, jako nástroje sloužící k optimalizaci vybraných vlastností enzymů pro biotechnologické aplikace. Prezentovány budou příklady inženýrství halogenalkandehalogenázy DhaA z bakterie Rhodococcus rhodochrous NCIMB13064 vedoucího k třicetinásobnému zvýšení aktivity s meziproduktem chemických syntéz 1,2,3-trichlorpropanem, nárůstu termostability o 20°C nebo zvýšení enantioselektivity s ethyl-2-brompropionátem z E-hodnoty 72 na průmyslově využitelnou úroveň selektivity vykazující E-hodnotu >200.

O67
Umíme vylepšit vazebnou doménu receptoru pro gama interferon?

Biedermannová L., Vondrášek J., Kuchař M., Li J., Petroková H., Jeřábek P., Šebo P.
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.
lada.biedermannova@gmail.com

Gama interferon (γ-IFN) je klíčovou součástí imunitní odpovědi savců na virovou infekci. Jeho produkce fagocyty a pomocnými CD4+ T-lymfocyty v odpovědi na rozpoznání antigenu, vázaného na antigen-prezentující buňce, plní důležiou signalizační a imunoregulační úlohu. Vazba γ-IFN na receptor γ-IFN (IFNGR1) aktivuje u antigen prezentující buňky JAK-STAT signalizační dráhu a stimuluje tak její růst a diferenciaci.
Je zřejmé, že γ-IFN nabízí řadu možností využití v lékařství; detekce γ-IFN se využívá například pro diagnostiku latentní tuberkulózy. Test je nicméně založen na detekci protilátkami metodou ELISA a je poměrně časově i finančně náročný. V naší labaratoři pracujeme na vývoji levného a robustního biosenzoru použitelného i v polních podmínkách. Jako jeho základní komponenta pro molekulární rozpoznání γ-IFN byl zvolen receptor IFNGR1. Kromě přirozené afinity ke γ-IFN nabízí ve srovnání s protilátkami řadu výhod, zejména malou velikost a stabilitu, umožňující snadnou a levnou produkci.
Pro spolehlivou detekci γ-IFN v biosenzoru je však nutné zvýšit afinitu IFNGR1 zhruba o dva řády, na ~ 10exp(-11). Toho je možné dosáhnout dvěma strategiemi, které vzájemně kombinujeme - racionálním designem a "high-throughput" selekcí vylepšených variant repeceptoru in vitro. Racionální design je založený na počítačové analýze známé struktury komplexu γ-IFN/IFNGR1. Umožňuje určit aminokyselinové zbytky, klíčové pro vazbu IFNGR1 ke γ-IFN, předpovědět vliv jejich mutace na afinitu a následně provést jejich cílenou mutagenezi. High-throughput selekce je založená na metodě vystavení protenu na ribosomu in vitro a teoreticky umožňuje paralelní selekci proteinové knihovny o velikosti až 10exp(14) variant.
Úspěšné dokončení projektu dovolí nejen konstukci nástroje pro snazší diagnostiku některých chorob, ale naším cílem je rovněž pokrok v porozumění principům proteinových vazebných interakcí a zpřesnění současných výpočetních metod pro predikci proteinové struktury.

O68
Using catalase and invertase from magnetically responsive Saccharomyces cerevisiae cells

Šabatková Z., Šafařík I., Šafaříková M.
Oddělení biomagnetiských technik, Ústav systémové biologie a ekologie, AV ČR v.v.i., České Budějovice
sabatkoz@usbe.cas.cz

Catalase (hydrogen-peroxide:hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.6) and invertase (beta-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) are common component of Saccharomyces cerevisiae cells (bakers' yeast). This yeasts are of special interest, due to their broad application in food industry; they are classified as "Generally recognized as safe (GRAS)". Catalase is usually adding to destroy the excess of hydrogen peroxide (HP). HP is a very effective microbicidal agent. A major reason for the growth in popularity of HP is its low toxicity at use concentrations. Commercial catalase preparations are rather expensive. In selected cases crude microbial extracts from appropriate microbial producers can be used.
Invertase is an enzyme widely used in the food and drink industry. Enzymatic hydrolysis of sucrose by invertase results in the formation of an equimolar mixture of glucose and fructose, known as invert sugar. The later is sweeter and easer to incorporate in industrial preparations. The enzyme invertase has been found in bacteria, fungi, insects, mammals and vegetables, but the yeasts are the main industrial source.
In order to simplify manipulation with the biocatalyst, we have prepared magnetically responsive alginate beads containing entrapped Saccaromyces cerevisiae cells and magnetite microparticles. Larger beads (2-3 mm in diameter) were prepared by dropping the mixture into calcium chloride solution while microbeads (the diameter of majority of particles 50 - 100 Ķm) were prepared using the water in oil emulsification process. In general, microbeads enabled more efficient HP decomposition and formation of invert sugar. The biocatalyst was quite stable; the same catalytic activity was observed after one month storage at 4 ľC and the microbeads could be used at least five times. Due to the presence of variety of enzymes in the entrapped yeast cells, this inexpensive biocatalyst can also be used for other biotechnology processes.

O69
Growth kinetics of sulfur-oxidizing bacteria and kinetic models

Mandl M., Omesová Pokorná B., Janiczek O.
Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno
mandl@chemi.muni.cz

Oxidation of elemental sulfur to sulfuric acid plays an important role in biohydrometallurgy and formation of acid mine drainage. The purpose of this study was to investigate changes in growth and oxidation kinetics in cultures of Acidithiobacillus ferrooxidans to evaluate their application for kinetic models. The values of maximum sulfur oxidation rate (v) and growth yield on sulfur (Y) were determined from data obtained in 86 batch cultures using bioreactors and shakers under conditions described earlier [1-2]. Although no trend changes of the v and Y within the same culture occurred, both the constants demonstrated very different values in different cultures of the same strain. Some differences exceeded one order of magnitude [1]. No significant correlation between the v and Y values was observed. Two metabolic phases of ATP formation were observed. During the second one, the rate of cell growth did not correlate with the rate of ATP formation. Apparent Michaelis constant for sulfur in resting cells was dependent on cell concentration [3]. The reason for the above significant changes remains unclear. As a result of this, the comparison and prediction of the kinetic constants is uncertain. Traditional kinetic approaches (exponential growth, the Monod equation) could be used for data of cell growth and sulfur oxidation. However, the above variations of kinetic constants represented substantial limits for the kinetic model application to predict the bioprocess course.
Supported by grants No. 525/08/0697 from the Czech Science Foundation and MSM0021622413 from the Czech Ministry of Education.

References
[1] Pokorna B., Mandl M., Borilova S., Ceskova P., Markova R. and Janiczek O. 2007. Appl. Environ. Microbiol. 73: 3752-3754.
[2] Ceskova P., Mandl M., Helanova S. and Kasparovska J. 2002. Biotechnol. Bioeng. 78: 24-30.
[3] Mandl M., Pokorna B. and Gavlasova P. 2007. Adv. Mater. Res. 20: 477-480.

O70
Velkoobjemová produkce proteinů a enzymů: Nové trendy v biotechnologiích

Čikošová M.
LONZA Biotec, s.r.o, Okružní 134 281 61 Kouřim
miroslava.cikosova@lonza.com

The biotechnology industry has seen a rapid increase in therapeutic protein and enzymes production over the past few years. This has placed an increasing demand on downstream purification operations to handle greater amounts of enzyme while maintaining high quality standards and process throughput.
Proteins and enzymes production consist of two stages: 1) expression of protein or enzyme in heterologous system, and 2) separation of the protein from other components such as DNA, membrane structures and other host cell proteins. Conditions are usually optimized for expression and purification of individual product. Traditional purification procedures (centrifugation, tangential flow filtration ion exchange chromatography, decolorization, vacuum drying and lyophilization) in combination with new ones (hydrophobic interaction chromatography and proteins crystallization) are commonly used. Affinity purification resins coupled to divalent metal ions or other compounds are commercially available from several vendors and also robust proteins and enzymes crystallization procedures were developed.
Since reproducibility and robustness are critical to the success of production, their investigation during process limits studies is critical part of technology transfer. In this final stage of technology transfer all in process methods and limits for purity, potency, identity and antigenicity have to be properly defined, qualified or validated.

O71
Proteinové inženýrství a farmaceutický průmysl – bioléčiva

Fusek M.
Life Sciences Capital s .r. o, Praha, Štěpánská 11/538, 120 00 Praha 2 - Nové Město
m.fusek@lscapital.cz

Vznik nového směru výroby léků – výroba rekombinantních peptidů a proteinů se datuje na počátek 80. let minulého století. Na trh byl tehdy uveden rekombinantní insulin (v roce 1982). Postupně na trh přicházely další typy funkčních molekul jako hormony, enzymy či protilátky, vyráběné expresí rekombinantních proteinů. Nyní je na trhu více než 100 léků, které spadají do kategorie rekombinantních léčiv či vakcín, a podíl na prodejích pro tato léčiva již dosahuje zhruba 15 % celkových prodejů ve farmaceutickém průmyslu. Pro farmaceutický průmysl znamenal vstup do výroby a prodeje rekombinantních proteinů jednu z příležitostí jak překonat určitou krizi, kterou tento průmysl procházel v 90. letech. Proto originální výrobci léčiv vyvinuli značné úsilí, aby získali na rozvoji tohoto nového směru podíl. Na druhou stranu, zcela odlišný způsob výroby, rozdíly v analytických metodách a nové postupy schvalování znamenaly značné náklady a nutnost výrazně změnit myšlení.
Rekombinatní proteinová léčiva se nyní používají jako náhražky proteinů dříve vyráběných izolací z krve dárců (například faktory krevního srážení), nebo izolovaných ze zvířecích zdrojů (například insulin). Ale řada látek by bez rekombinantních technologií nebyla dostupná. Příkladem mohou být cytokiny, růstové faktory a monoklonální protilátky. Avšak proteinové inženýrství umožňuje výrobu léčiv, jejichž struktura je oproti přirozeně se vyskytujícím proteinům pozměněna k lepším terapeutickým vlastnostem. Příkladem mohou být analoga insulinu či tkáňový aktivátor plasminogenu.
V anglické literatuře se pro tato léčiva ujal pojem „biodrugs“ a pro celý obor, který hledá a produkuje léky získávané na bázi biotechnolockých procesů, je používán název „biopharmaceuticals“ nebo „biopharma“. V českém jazyce nejsou zatím vytvořeny ekvivalenty. Situace v názvosloví je možná odrazem velmi nízkého zájmu českého průmyslu o tuto dynamicky se rozvíjející oblast.

Postery

P138
Vliv modifikací na katalytickou aktivitu chladově aktivní beta-D-galaktosidasy z Arthrobacter sp. C2-2

Luňáčková T., Lipovová P., Benešová E., Králová B., Ulbrichová D.
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6,166 28, ČR
Tereza.Lunackova@vscht.cz

Beta-D-galaktosidasa (EC 3.2.1.23) z psychrotrofní bakterie Arthrobacter sp. C2-2 katalyzuje hydrolytické a transgalaktosylační reakce beta-D-galaktopyranosidů. Tento chladově aktivní enzym je homohexamer složený ze dvou trimerů. Každý monomer má své vlastní aktivní místo.
Pomocí cílené mutagenese některých aminokyselin lze vysvětlit jejich vliv na teplotní a katalytické vlastnosti enzymu. Další možností cílené mutagenese je příprava tzv. glykosynthas z glykosidas. Jedná se o mutanty, které nejsou schopny katalyzovat hydrolýzu přirozených substrátů, ale u kterých v přítomnosti glykosylfluoridu jako substrátu dochází ke zvýšení výtěžku transglykosylačních reakcí až na 90 %. V této práci byla pomocí mutagenese vyměněna kyselina glutamová za alanin či glycin (mutanty E521A a E521G) s cílem připravit první glykosynthasu z chladově aktivního enzymu. Mutant C999A měl objasnit význam cysteinu pro vazbu aglykonu do aktivního místa. Dále byla zkoumána možnost separace trimerů pomocí chemické modifikace povrchových argininů a následně byla ověřována jejich katalytická aktivita.
Tato práce vznikla za podpory MŠMT: MSM6046137305 a GAAV: KJB 500500512.

P139
The fates of culturable bacteria in heavy-metal-contaminated soil

Karelová E., Harichová J., Ferianc P.
Ústav molekulárnej biológie SAV v Bratislave
Peter.Ferianc@savba.sk

To use bacteria for bioremediation, it is important to obtain strains that are specific to particular contaminated sites, are culturable, and have high pollutant-degradation activity. With the ultimate aim of developing bioremediation technology for each pollutant using the optimum bacterial consortia that combine them artificially, in the present study we performed phylogenetic analysis to examine both, the community of culturable bacteria and heavy-metal resistance genes carried by these bacteria isolated from nickel-, cobalt-, zinc-, iron-, copper- and cadmium-contaminated soil. We also identified the nearest relatives of the culturable bacteria and heavy-metal resistance genes that were influenced by these heavy metals. Phylogenetic analysis showed four bacterial groups in the heavy-metal-contaminated culture: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria (Alfa-, Beta- and Gammaproteobacteria) in which Proteobacteria predominated. In addition, all isolates were able to grow in the presence of investigated heavy metals, and their growth rate correlated with metal concentrations in soil sample. Furthermore, 21 isolates carried either czcA- or nccA-like heavy-metal-resistance determinants, products of which were identified either as heavy metal efflux pump CzcA or cation efflux system membrane proteins as well. These bacteria may be involved in heavy metal removal processes.

Acknowledgements
This work was supported by VEGA Grant No. 2/7022/7, APVV No. 51-0248-05 and APVV No. 20-0540-05.

P140
Expression of arabidopsis thaliana vacuolar cytokinin oxidase/dehydrogenases in pichia pastorka

Kowalska M., Šmehilová M., Galuszka P., Frébort I.
Katedra Biochemie, Oddělení Molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
mk3l07@gmail.com

Production of vacuolar plant proteins in a recombinant yeast system may be problematic due to possible misinterpretation of the signal sequence by the heterologous host. The complexity and low amino acid sequence homology of the vacuolar signals preclude exact understanding of the protein targeting. We study the family of seven cytokinin dehydrogenase enzymes (CKX, EC 1.5.99.12) that control the metabolism of plant hormones cytokinins in Arabidopsis thaliana. Individual members of the family share conserved protein regions of high homology (e.g. FAD-binding domain), but differ in catalytic properties, subcellular localization and expression pattern in plant organs and tissues. Two genes coding for vacuolar cytokinin dehydrogenase enzymes AtCKX1 and AtCKX3 from Arabidopsis thaliana were chosen for protein overproduction in Pichia pastoris. In order to facilitate purification, recombinant proteins were fused with His-tag domain. The fusion on the C-terminal end of the proteins, however, proved to be useless in affinity purification. Therefore a novel vector was prepared from pGAPZαA by inserting a coding sequence for 10x His from pET16b between the α-factor coding sequence and the multiple cloning site. With both studied proteins, the sequence coding for N-terminal fragment predicted by SignalP 3.0 as a leader peptide was removed before cloning into pGAPZαA to obtain secretion from yeast using the N-terminal α-factor signal sequence.
Initial experiments, however, did not lead to secretion of active proteins. More accurate amino acid sequence analysis of AtCKX1 and AtCKX3 revealed the presence of a region resembling N-terminal sequence-specific vacuolar sorting signal (ssVSS) that typically contains degenerate signal [N/L]-[P/I/L]-[I/P]-[R/N/S], also called NPIR consensus sequence, and targets proteins to lytic vacuoles. Only after deleting this motif, active plant vacuolar cytokinin dehydrogenases were obtained in Pichia pastoris.

P141
Heterologní exprese nitrilasy z Aspergillus niger K10

Kaplan O., Martínková L., Kavan D., Bezouška K., Vejvoda V., Plíhal O., Benada O., Pompach P., Vaněk O., Kumar V.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Centrum biokatalýzy a biotransformací, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Praha 4; Katedra biochemie, Přírodovědecká Fakulta University Karlovy, Hlavova 8; Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Laboratoř elektronové mikroskopie, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Praha 4
ondrej.kaplan@gamil.com

Vláknitá houba Aspergillus niger K10 produkuje v průběhu kultivace na mediu s 2-kyanopyridinem vysoké množství intracelulární nitrilasy. Tento enzym byl purifikován a charakterizován [1]. Jedná se o velký homooligomerní protein o molekulové hmotnosti 0.6 – 1.1 MDa, který tvoří šroubovicovité struktury. Molekulová hmotnost podjednotky je 38.5 kDa. Enzym preferuje jako substráty (hetero)aromatické nitrily a nejvyšší aktivitu (91.6 U/mg s benzonitrilem) vykazuje při 45°C a pH 8.0. Z mycelia byla izolována celková RNA a reverzní transkripcí připravena cDNA. Gen kódující nitrilasu byl amplifikován pomocí PCR, sekvenován a ligován do expresních vektorů pET-30(+) a pRSET B. Ty byly vneseny do 9ti různých expresních kmenů E. coli. Exprese rekombinantního proteinu byla indukována přídavkem 1 mM IPTG. Nitrilasa byla exprimována ve většině expresních kmenů a tvořila hlavní podíl rozpustných buněčných proteinů. Zatímco původní producent byl schopen produkovat 160 U/L, transgenní E. coli BL21 gold produkoval 230 U/L. V současnosti probíhají testy použitelnosti kvasinky Pichia pastoris X-33 s expresním vektorem pPIZ@ A jako alternativního heterologního producenta.
Finanční podpora: LC06010 (MŠMT), IAA500200708 (GA AV ČR), AV0Z50200510.

[1] O. Kaplan, V.Vejvoda, O. Plíhal et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 73 (2006) 567.

P142
Operational stability of fungal nitrilases in continuous stirred membrane reactors

Malandra A., Martínková L., Cantarella M., Kaplan O., Vejvoda V., Štěpánková B., Kubáč D.
Department of Chemistry, Chemical Engineering and Materials, University of L'Aquila, Monteluco di Roio, I-67040 L'Aquila, Italy; Institute of Microbiology AS CR, Centre of Biocatalysis and Biotransformation, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic
annamalandra@virgilio.it

The stability of new nitrilases from Fusarium solani O1 and Aspergillus niger K10 was examined in laboratory-scale continuous stirred membrane reactors (CSMRs). A system consisting of two CSMRs was also tested, in which the first reactor contained a fungal nitrilase and the second one a bacterial amidase. The aim of this bienzymatic system was to increase the purity of the reaction products, carboxylic acids, as the nitrilases produced some amides as by-products from nitriles. The benefits of the nitrilase F. solani O1 is its higher stability (half-time of 53 h at 40 °C) compared with the enzyme from A. niger K10 (half-time of 25 h under the same conditions) and its better chemoselectivity (at least 97 % purity of products). The stability of the former enzyme was further improved by its immobilization in cross-linked enzyme aggregates. Hydrolysis of the by-product amide by the amidase lead to a highly pure carboxylic acid (e.g., ca. 99.9% isonicotinic acid, a tuberculostatic intermediate, from 4-cyanopyridine).

Aknowledgement. Financial support through projects IAA 500200708, LC06010, COST/ESF CM0701 and AV0Z50200510.

P143
Vliv struktury akceptoru a reakčních podmínek na výtěžek galaktosylace

Blažek J., Riedl J., Lipovová P., Holý A., Králová B.
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR
Jiri.Blazek@vscht.cz

Transformace na galaktosid je jednou z možností přípravy proléčiv, která se často vyznačují vyšší stabilitou v organismu, vyšší rozpustností ve vodném prostředí či lepší chutí oproti výchozí látce. Možným benefitem je cílení glykosidů pomocí lektinů k specifickým tkáním.
Methody organické synthesy vyžadují řadu mezikroků, jež snižují celkový výtěžek preparace. Levnou a snadnou methodu přitom představuje glykosylace pomocí transglykosidasové aktivity glykosidas, která probíhá v nadbytku vhodného substrátu jako boční reakce k hydrolyse.
V této studii byla zkoumána transgalaktosylační reakce beta-galaktosidasy
C 221 z Arthrobacter sp. C 2-2 s ohledem na reakční podmínky a strukturu použitého akceptoru. Z reakčních podmínek byl sledován efekt teploty a koncentrace substrátu hydrolysy – laktosy. Jako akceptory sloužily acyklické nukleosidy pyrimidin-2-onu a adeninu, přičemž sloučeniny tohoto typu jsou užívány jako antivirotika.
Byl pozorován vliv heterocyklické base acyklického nukleosidu i struktury jeho alifatické části na výtěžek, jenž byl dále ovlivněn teplotou. Zatímco vliv alifatického části je možné vysvětlit přizpůsobením sterickým nárokům aktivního místa enzymu, vliv base a teploty vypovídá o thermodynamických aspektech reakce. V příspěvku budou všechny pozorované závislosti podrobně diskutovány.
Studie vznikla za podpory Gilead Sciences, Výzkumného centra UOCHB a grantů MŠMT ČR MSM6046137305, 1M0508.

P144
Vliv vápenatých iontů na akumulaci lipidů v mořské bakterii Alcanivorax borkumensis

Purkrtová Z., Králová B., Verstraete W., Sabirova J.
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, Praha 6, 166 28, Česká Republika; Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Ghent, Belgium
zita.purkrtova@vscht.cz

Bakterie Alcanivorax borkumensis kmen SK2 byla izolována z mořského naleziště s přirozeným únikem ropy. Její specializovaný metabolismum je charakterizován produkcí třech tříd lipidů (triacylglyceroly, polyhydroxyalkonáty a volné mastné kyseliny), jež jsou ukládány ve formě lipidových tělísek. A. borkumensis je využíván v řadě biotechnologií od produkce plastických hmot po degradaci alkanů při odstraňování ekologických havárií. Je známo, že vápenaté ionty hrají důležitou roli v životním cyklu lipidových tělísek jiných organismů, především při jejich vzniku a mobilizaci. Přítomnost vápenatých iontů na povrchu lipidových tělísek izolovaných z A. borkumensis poukázala na možný vliv vápenatých iontů na životní cyklus lipidových tělísek i v případě této mořské bakterie. Přítomnost vápenatých iontů v růstovém médiu nebyla nezbytná pro růst, nicméně ovlivňovala průběh a rychlost růstu. Naše výsledky naznačují, že vápník může stimulovat akumulaci lipidů při nízké koncentraci zdroje uhlíku. Vápník je také pravděpodobně spojen s mobilizací lipidových tělísek, zvláště v období hladovění. Naopak, naše výsledky popřely teorii, že akumulace vápenatých iontů na povrchu lipidových tělísek je způsob detoxikace těchto iontů, protože mutant deficientní v tvorbě lipidových tělísek byl schopen růstu v médiu s přebytkem uhlíku.
Tato práce byla podporována MSM6046137305.

P145
Porovnání vlastností tří rostlinných nukleas s potenciálním protinádorovým účinkem

Podzimek T., Matousek J., Lipovová P.
Ústav molekulární biologie rostlin, BC AVČR, Branišovská 31, České Budějovice 370 05; Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, Praha 6 166 28
podzimet@vscht.cz

V posledních letech jsou stále více studovány rostlinné nukleasy z hlediska jejich vlastností nebo funkce v rostlinách. Neméně zajímavá se jeví možnost využití protinádorového účinku rostlinných nukleas zjištěného u některých z nich.
Naše práce se zabývá charakterisací tří rostlinných nukleas, TBN1 z listů rajčete, HBN1 z pylu chmele a ABN1 z listů Arabis brassica. Tyto enzymy jsou schopné štěpit dsDNA, ssDNA a také RNA. Jejich teplotní optimum se pohybuje kolem 60 ˚C a pH optimum v rozmezí 5,9 - 6,3. Aktivita purifikovaných nukleas in vitro není stimulována přidáním dvojmocných iontů Zn2+, Ca2+, Mg2+ nebo Mn2+. Vykazují mezi sebou poměrně vysokou homologii v aminokyselinových sekvencích, z čehož pravděpodobně plynou jejich velice podobné katalytické vlastnosti. Jejich vlastnosti jsou také podobné rostlinným enzymům ze skupiny nukleasa I, které jsou schopny štěpit pouze jednořetězcové substráty.
Kromě biochemických vlastností byla zjišťována i cytotoxicita pro nádorové buňky. U TBN1 byl zjištěn významný protinádorový účinek na lidský melanom a neuroblastom a navíc vedlejší účinky byly mnohem mírnější v porovnání s BS-RNasou.
Tato práce vznikla za podpory MŠMT: MSM6046137305 a GAČR 521/06/1149.

P146
Nové metody pro stanovení aktivity nitrilas

Vejvoda V., Šveda O., Rinágelová A., Křen V., Martínková L.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Centrum biokatalýzy a biotransformací, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
Ondrejsveda@seznam.cz

Rychlé a jednoduché metody jsou důležité pro vysokokapacitní screening enzymových aktivit sbírkových kultur, isolátů z přírodního prostředí nebo genových knihoven. Spektrofotometrické metody většinou tyto podmínky splňují. V této práci jsme zkoušeli dvě metody spektrofotometrického stanovení aktivity nitrilas.
První metoda je založená na detekci změny pH, ke které dochází při tvorbě reakčních produktů nitrilas – karboxylových kyselin. Testováním 9 indikátorů pH bylo zjištěno, že lze použít reakční pufry v rozmezí pH 7,5 – 9,6 tak, aby vyhovovaly barevnému přechodu indikátoru a zároveň pH optimu enzymu.
Spektrofotometrické stanovení nitrilasové aktivity založené na rozdílných absorbancích substrátu (nitrilu) a produktu (karboxylové kyseliny) je nesnadné pro malé rozdíly v absorpčních spektrech těchto látek. Nicméně bylo nalezeno 16 aromatických a heterocyklických substrátů (benzonitril a deriváty, kyanopyridiny) vhodných pro měření nitrilasové aktivity v blízké UV oblasti.
Obě metody jsou vhodné pro kvalitativní stanovení aktivity. Pro kvantitativní stanovení je lépe použitelná metoda rozdílových spekter, zatímco při použití pH indikátorů je změna pH často ovlivněna i dalšími faktory (složením buněčných extraktů).
Financováno projekty IAA500200708 (GA AV ČR), LC06010 (MŠMT) a TANDEM FT-TA5/043 (MPO ČR).

P147
Optimalizace transientní transfekce buněčné linie HEK 293 v bezsérovém médiu

Kyselá H., Orság P., Ševčík M.
VUT Fakulta chemická, Brno ; BioVendor - Laboratorní medicína a. s., Modřice ; BioVendor - Laboratorní medicína a. s., Modřice
sevcik@biovendor.com

Rekombinantní proteiny mají široké využití v současném biomedicínském výzkumu a medicíně. Jsou vyráběny v prokaryotických, eukaryotických i bezbuněčných systémech. S nástupem léčiv založených na rekombinantních protilátkách vzrostl velmi rychle význam eukaryotických a především savčích buněk jako systému pro jejich produkci. Výhodou savčích expresních systémů je především věrná podoba získaných rekombinantních molekul s jejich protějšky z lidského těla (např. správná glykosylace). Nevýhodou tohoto systému je kromě obecně vysokých nákladů především dlouhá doba vývoje stabilní produkující buněčné linie. Ta představuje několik měsíců až rok. Využití transientní transfekce buněčné linie namísto běžně užívané stabilní transfekce významně zkracuje vývoj nového rekombinantního proteinu. Zde se zmiňujeme o optimalizaci podmínek transientní transfekce buněčné linie HEK 293. Transfekce byla prováděna pomocí lineárních polyethyleniminů (PEI) v bezsérovém tkáňovém médiu. Buňky byly transfekovány vektorem nesoucím sekretovanou lidskou placentální alkalickou fosfatázu (SEAP). Jako míra účinnosti transfekce byla stanovována koncentrace SEAP ve tkáňovém médiu. Při optimálním poměru DNA a PEI byla dosažena koncentrace 25 mg/L ve 24 jamkových tkáňových deskách a 40 mg/L ve 100 mL třepaných lahvích se čtvercovým dnem.

Přednášky

O72
Úvod. Reduktivní stres jako předpoklad stresu oxidativního

Wilhelm J.
Ústav lékařské chemie a biochemie, 2.LF UK, Praha
jiri.wilhelm@lfmotol.cuni.cz

Oxidativní stres, tj. nerovnováha mezi oxidačními a antioxidačními procesy, závisí ve velké míře na produkci tzv. reaktivních sloučenin kyslíku (ROS). V obecném tvaru si jejich vznik můžeme vyjádřit následující rovnicí: RH + O2→R* + + HO2* Pro rychlost vzniku radikálů dostáváme: v = k [RH] . [O2] To znamená, že ke zvýšení jejich produkce může dojít jak při zvýšení koncentrace kyslíku, tak při zvýšení koncentrace redukovaných substrátů, kterýžto stav se nazývá reduktivní stres. Za normoxických podmínek udržuje buňka redox páry v jistých fyziologických mezích. Máme relativně oxidovaný pár NAD/NADH a relativně redukované páry NADP/NADPH a GSSG/GSH. Když se poměry koncentrací v redox párech posunou ke zvýšenému zastoupení redukovaných koenzymů, vytvářejí se podmínky pro vznik reduktivního stresu. Ten může zvýšit produkci ROS různými mechanismy: 1) únikem z mitochondrií, 2) zvýšením aktivity NAD(P)H-oxidasy, 3) zvýšením aktivity xantinoxidasy, 4) zvýšením aktivity cyklooxygenasy, 5) redukcí železitých iontů. Indikátorem změn redox stavu v cytoplasmě je poměr laktát/pyruvát, v mitochondriálním kompartmentu ß-hydroxy- butyrát/acetoacetát. Kritickou úlohu hraje GSH. Buňka má dva oddělené pooly GSH, cytosolický a mitochondriální. Jelikož je syntéza GSH lokalizována v cytosolu, do mitochondrií se dostává aktivním transportem. Produkci ROS mitochondriemi řídí membránový potenciál vnitřní membrány. Ten je určován pórovým komplexem, označovaným jako mitochondrial permeability transition pore – MPTP. Má dvě napěťově závislá místa, jedno v rovnováze s párem GSSG/GSH a druhé s pyridinovými nukleotidy. MPTP je uzavřen za redukčních podmínek a otevřen za oxidačních. Normálně se rychle přepíná mezi otevřeným a zavřeným stavem, což udržuje membránový potenciál. Když se mitochodriální GSH zoxiduje, zkolabuje membránový potenciál a začne apoptóza. Snížení poměru GSSG/GSH blokuje otevírání MPTP, což zvětší negativitu membránového potenciálu a zvýší produkci ROS.

O73
Súčasný pohľad na oxidačný stres a antioxidanty

Ďuračková Z., Muchová J.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK Bratislava
zdenka.durackova@fmed.uniba.sk

Oxidačný stress je fenomén, ktorý sa dáva do súvislosti s patológiou viacerých ochorení, medzi ktoré patrí ateroskleróza, neurodegeneratívne ochorenia, ako Alzheimerova a Parkinsonova choroba, rakovina, diabetes mellitus, ale aj psychické poruchy či proces starnutia. Oxidačný stres sa definuje ako nerovnováha medzi tvorbou voľných radikálov a reaktívnych metabolitov, tzv. oxidantov a ich odstraňovaním pomocou ochranných mechanizmov, ktoré sa súhrnne označujú ako antioxidačné systémy. Dôsledkom takej nerovnováhy je poškodenie významných biomolekúl a orgánov s možným dopadom na celý organizmus.
Oxidačné a antioxidačné procesy sa spájajú s prenosom elektrónov, čím sa ovplyvňuje redoxný stav buniek a organizmu, takže pojem oxidačný stres sa tiež označuje ako redoxný stres.
V súčasnosti sa však pripúšťa aj názor, že oxidačný stres nie je vždy škodlivý. V závislosti od intenzity môže hrať úlohu pri regulácii iných významných procesov cez moduláciu signálnych dráh a tým ovplyvňovať syntézu antioxidačných enzýmov, zápalový proces, procesy apoptózy a proliferácie buniek a tým procesy malignity. Nerozumné podávanie antioxidantov by preto mohlo mať negatívny dopad na organizmus.
Do redoxnej rovnováhy organizmu zasahujú významne prírodné polyfenolové látky, ktoré sú bežnou súčasťou potravy. Tieto látky sa vyznačujú významnou antioxidačnou aktivitou in vitro. Ich príspevok k antioxidačnej kapacite organizmu ako aj iné modulačné vlastnosti budú v príspevku diskutované.

Poďakovanie: Práce prezentované v príspevku boli finančne podporené VEGA grantmi MŠ SR 1/1157/04, 1/4310/07, 1/4306/07, 1/4309/07, MVTS grantmi MŠ SR a občianskym združením Rozum a Zdravie.

O74
Volné radikály a mitochondrie

Drahota Z.
Fyziologický ústav AVČR, Praha
drahota@biomed.cas.cz

Mitochondrie v eukaryotických buňkách transformují energii živin do molekuly ATP mechanismem oxidační fosforylace. Součástí tohoto mechanismu je přenos elektronů oxidoredukčními komponentami respiračního řetězce na cytochrom c oxidázu. Ta elektrony využívá k redukci molekulárního kyslíku. Jednoelektronový přenos představuje riziko vzniku kyslíkových radikálů (ROS) přímou interakcí elektronů s molekulárním kyslíkem a tvorbu superoxidového aniontu. Mitochondrie tak zaujímají významné místo tvorby ROS v živočišných buňkách. Za fyziologických podmínek je únik elektronů kontrolován soustavou antioxidačních enzymů a oxidoredukčních molekul. Avšak poškození funkce respiračního řetězce, např. poruchou biogeneze mitochondriálních komponent stejně jako porucha antioxidačních ochranných mechanizmů aktivuje tvorbu ROS. Tento peroxidační stres iniciuje degradační, nekrotické a apoptotické procesy. V posledních letech je věnována mimořádná pozornost mechanismům tvorby ROS a jsou definovány lokusy jejich tvorby na respiračním řetězci. Ke komplexu III, tak přibyl komplex I a II, glycerofosfát dehydrogenáza a ketoglutarát dehydrogenáza.V postatě všechny komponenty respiračního řetězce, kde dochází k přenosu elektronu systémem chinon, semichinon, chinol, jsou potenciálními zdroji tvorby ROS. Intensivně jsou také studovány látky s antioxidačním působením, které lze klinicky aplikovat a snižovat tak negativní dopad oxidačního stresu a rozvoj nekrotických procesů.

Drahota Z, Chowdhury S, Floryk D, Mráček T, Wilhelm J, Rauchová H, Lenaz G, Houštěk J: Glycerophospahte-dependent hydrogen peroxide production by brown fat mitochondria. J Bioenerg Biomembr 2002, 34, 105-113
Vrbacký M, Drahota Z, Mráček T, Vojtíšková A, Ješina P, Stopka P, Houštěk J: Respiratory chain components involved in the glycerophosphate-dependent ROS production by brown adipose tissue mitochondria. Biochim Biophys Acta, 2007, 1767, 989-997

O75
Oxidačné poškodenie DNA a reparačná schopnosť ako marker oxidačného stresu

Paduchová–Chovanová Z.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava, Slovensko
zuzik78@gmail.com

V ľudskom organizme podliehajú oxidačnému poškodeniu (OS) mnohé biomakromolekuly, čo môže mať význam v patogenéze mnohých ochorení (napr. rakovina, diabetes, cievne choroby a iné). Na štúdium účinku OS u ľudí sú vhodné ako biomarker oxidačné produkty DNA, ktoré sú relatívne ľahko merateľné. Medzi tieto produkty patria 8-oxo-7,8-dihydroguanín (8-oxoG), 8-oxodeoxyguanozín (8-oxodG) a tiež formamidopyrimidíny FapyA a FapyG, ktoré sa však tvoria v oveľa menšom množstve ako 8-oxoG. Existuje množstvo metód na stanovenie týchto produktov, avšak významnú úlohu hrá enzýmová metóda, ktorá je menej náchylná na falošnú oxidáciu, pretože príprava vzorky je krátka a jemná. Ide o kométovú metódu, ktorá stanovuje stupeň oxidačného poškodenia DNA (OP) v bunke cez detekciu jednovláknových zlomov v DNA. Je známe, že OP sa vyskytuje v zdravom organizme relatívne v malom množstve vďaka rovnováhe medzi jej poškodením a reparáciou reparačnými systémami. Preto stanovenie reparačnej schopnosti DNA (RS) (modifikovaná kométova metóda) sa v poslednom čase začína častejšie používať v rôznych štúdiách na stanovenie vplyvu rôznych faktorov vonkajšieho a pracovného prostredia. Je teda vhodné stanoviť RS spoločne s OP pri riziku rakoviny a iných ochoreniach spojených s OS.
V našej štúdii sme porovnávali OP a RS u zdravých dobrovoľníkov (priemerný vek 42,2 roka, n=25) a u pacientov s osteoartritídou kolenného kĺbu (OA) (priemerný vek 54 rokov, n=49). Zistili sme signifikantne vyššie OP u pacientov s OA oproti zdravým kontrolám (1,180Ī0,105 vs. 0,607Ī0,076 8-oxoG/106G, P=0,0005). Zaujímalo nás, aká je RS u týchto skupín a zistili sme, že pacienti s OA ju majú signifikantne vyššiu v porovnaní s kontrolou (p<0,0001). Predpokladá sa, že reparačné enzýmy najskôr vystrihnú poškodené bázy, čím sa zvýši množstvo apurínových miest a súčasne aj množstvo hydrolyzovaných 8-oxoG. Za vystrihnutím nasleduje syntéza nových báz, takže počet zlomov sa môže znižovať.
Poďakovanie: VEGA 1/0224/08,OZ Rozum a Zdravie

O76
Myeloperoxidasová modulace metabolitů arachidonátu a linolátu in vivo

Kubala L., Schmelzer K. R., Hammock B. D., Lojek A., Eiserich J. P.
Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135, 61265 Brno, Czech Republic; Departments of Internal Medicine, Entomology, and Physiology and Membrane Biology, University of California, Davis, CA, USA
kubalal@ibp.cz

Acute inflammation is common sign of pathologies such as septic shock. A characteristic feature of acute inflammation is formation of bioactive lipid peroxidation products of polyunsaturated fatty acids that play significant regulatory roles. Myeloperoxidase (MPO) is an abundant phagocyte-derived hemoprotein released during phagocyte activation. Herein, a role of MPO in modulation of the biologically active arachidonic (AA) and linoleic acid (LA) metabolites during acute inflammation was evaluated. Comprehensive arrays of LA and AA oxidation products in plasma of wild-type and MPO-deficient mice exposed to endotoxin for 24 hours were characterized. Significantly decreased levels of the epoxides of LA and corresponding fatty acid diols of both LA and AA were detected in MPO-deficient mice compared to wild-type mice. Similarly, hydroxy intermediates of AA and LA, hydroxyeicosatetraenoic and hydroxyoctadecadienoic acids, were significantly decreased in MPO-deficient mice. In contrast, significantly higher levels of cysteinyl-leukotrienes with well-known pro-inflammatory properties were observed in MPO-deficient mice. In vitro experiments with isolated polymorphonuclear neutrophils confirmed the in vivo observations. Our results reveal that MPO, either directly or indirectly, modulates the balance of pro- and anti-inflammatory lipid mediators during acute inflammation with a consequent efficacy to control acute inflammatory diseases.

O77
Volné radikály u rostlin

Wilhelmová N., Procházková D., Lubovská Z., Wilhelm J.
Ústav experimentální botaniky AV ČR vvi, Praha; Přírodovědecká fakulta UK, Praha; 2. lékařská fakulta UK, Praha
wilhelmova@ueb.cas.cz

Podobně jako všichni aerobové jsou rostliny nevyhnutelně vystaveny působení reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty vznikají jako vedlejší produkt při mnoha metabolických pochodech. Vedle toho existují i i specifické zdroje, produkující tyto reaktivní molekuly. Buňky mají pro udržování jejich homeostáze systémy, které se podílejí na jejich odstraňování. Antioxidační ochrana sestává z nízkomolekulárních látek a enzymů, jsou přítomny ve všech buněčných kompartmentech. Oproti živočichům obsahují buňky zelených částí rostlin navíc chloroplasty, které jsou významným zdrojem ROS. Jejich tvorba se v rostlině zvyšuje jednak při stárnutí, tak v nepříznivých podmínkách při biotickém či při abiotickém stresu. Dlouhodobě zvýšená koncentrace velmi reaktivních ROS však navozuje oxidační poškození jednotlivých buněčných komponent. Oxidační poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin bylo pozorováno při stresech i během stárnutí, souhrnně se označuje jako oxidační stres.
V poslední době byla přehodnocena koncepce volných radikálů jako pouze nežádoucích škodlivých produktů, byla rozpoznána i jejich užitečná úloha v metabolismu rostlin. Ta souvisí s působením ROS jako sekundárních poslů v signálních kaskádách v nejrůznějších procesech souvisejících např. s růstem, vývojem, odpověďmi na stresy a obranou. Specificita biologické odpovědi na ROS závisí na mnoha faktorech: typ ROS, intenzita signálu, místo produkce, vývojové stadium rostliny a interakce s dalšími signálními molekulami jako oxid dusnatý, lipidové posly a rostlinné hormony.

O78
Oxidačné poškodenie lipidov a bielkovín v srdci potkana počas starnutia

Kaplán P., Tatarková Z., Babušíková E., Sivoňová M., Račay P., Lehotský J., Dobrota D.
Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského, Martin
kaplan@jfmed.uniba.sk

Biologické starnutie charakterizuje postupné zhoršovanie funkčných schopností organizmu. Podľa tzv. voľnoradikálovej teórie je príčinou tohto procesu nárast oxidačného poškodenia molekúl voľnými radikálmi a inými reaktívnymi formami kyslíka. Kľúčovú úlohu v procese starnutia zohrávajú posttranslačné oxidačné modifikácie bielkovín, narušujúce štrukturálnu a funkčnú integritu tkanív. Našim cieľom bolo preskúmať koreláciu medzi vekom a oxidačným poškodením lipidov a bielkovín srdca. Analýza homogenátov a subcelulárnych frakcií izolovaných zo sŕdc 6-, 15- a 26-mesačných potkanov kmeňa Wistar ukázala vekovo-závislý pokles aktivity enzýmov a transportných proteínov. Funkčné zmeny bielkovín korelovali s akumuláciou oxidačných poškodení – oxidáciou tiolových skupín, tvorbou dityrozínov a konjugátov bielkovín s produktom lipidovej peroxidácie, 4-hydroxynonenalom. Pokles celkovej antioxidačnej kapacity srdca a plazmy, ktorý sme pozorovali u 15- a 26-mesačných potkanov naznačuje, že jednou z príčin oxidačného poškodenia srdcových buniek počas starnutia je znížená schopnosť organizmu eliminovať voľné radikály.

O79
Použití elektronové paramagnetické rezonance na detekci volných radikálů v biologických systémech

Pospíšil P.
Oddělení biofyziky, Katedra experimentální fyziky,Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, ČR
pospip@prfnw.upol.cz

Volné radikály vznikají v živých systémech jako vedlejší produkty biochemických procesů spojených převážně s přenosem elektronů nebo excitační energie. Za aerobních podmínek, postupná jednoelektronová redukce molekulárního kyslíku vede ke vzniku volných kyslíkových radikálů: superoxidového aniontového (O2·-) a hydroxylového (ŠOH) radikálu. Volné kyslíkové radikály mohou být detekovány pomocí elektronové paramagnetické rezonanční (EPR) spektroskopie. Přímá detekce volných kyslíkových radikálů pomocí EPR spektroskopie není možná, neboť doba života volných kyslíkových radikálů je příliš krátká (ms-ns). Proto se s výhodou používají vychytávače spinů (spin-traps), které po interakci s volnými kyslíkovými radikály vytvářeji stabilní radikálový komplex. Fotosystém II (PSII) lokalizovaný v thylakoidní membráně chloroplastů je vhodným modelovým systémem pro studium mechanistických principů tvorby volných kyslíkových radikálů. Na základě EPR spin-trapping spektroskopie bylo ukázáno, že přenos elektronů ve PSII je spojen s tvorbou O2·- a ·OH. Redukované formy feofytinu, semichinonu a nehemového železa cytochromu b559 slouží jako donory elektronů na molekulární kyslík. Interakce O2·- s nehemovým železem vede k tvorbě na železo-vazeného peroxidu, jehož redukcí vzniká ·OH. Interakce O2·- s oxidovanou formou hemového železa cytochromu b559 vzniká molekulární kyslík (superoxid oxidasa), zatímco interakce O2·- s jeho redukovanou formou vede ke vzniku peroxidu vodíku (superoxid reduktasa).

Poděkovaní: Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6198959215 a Grantové agentury České republiky 522/06/0979.

O80
Úloha volných radikálů v gykooxidačních reakcích

Vytášek R.
Ústav lékařské chemie a biochemie 2.LF-UK
richard.vytasek@lfmotol.cuni.cz
Ústav lékařské chemie a biochemie 2.lékařské fakulty University Karlovy, Plzeňská 221, 150 00 Praha 5-Motol
richard.vytasek@lfmotol.cuni.cz

Glykooxidační poškození bílkovin vzniká neenzymatickou glykací přičemž jedna z řady následných reakcí po primárním navázání cukru na aminoslupinu je oxidace obvykle zapříčiněná reaktivními sloučeninami kyslíku. Nejčastěji modifikovanou aminokyselinou je lysin. Typickými representanty glykooxidační modifikace pouze jednoho lysinového zbytku jsou karboxyalkyllysiny (Ahmed 1986). Obvykle se stanovují karboxyalkyllysiny plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Výhodou imunochemických metod oproti chromatografickým je jak jejich láce, tak pracovní i instrumentální nenáročnost, přičemž citlivost a robustnost imunochemické metody je primárně určena příslušnou protilátkou . Komerčně dostupné protilátky proti karboxyalkyllysinům mají nízkou afinitu a ve většině aplikací „nefungují". Proto jsme připravili vlastní monoklonální protilátky (MAb) proti dvěma nejběžnějším – karboxymethyllysinu (CML) a karboxyethyllysinu (CEL). Použitý antigen pro imunizace myší byl modifikovaný bovinní serumalbumin (BSA) a pro detekci MAb imunoeseji ovalbumin, thyreoglobulin a krystalin. Modifikace in vitro byla prováděna reduktivní aminací s glyoxalovou resp. pyrohroznovou kyselinou. Hybridomy byly připraveny obvyklým způsobem elektrofůzí a testovány a selektovány pomocí obdobně modifikovaného ovalbuminu či thyreoglobulinu. Byly vybrány a namnoženy vhodné hybridomy produkující protilátky proti karboxymethyllysinu a karboxyethylllysinu.Vybrané vhodné monoklonální protilátky byly charakterizovány a testovány pro využití v imunoesejích.

Ahmed M. U., Thorpe S. R., Baynes J. W.: J Biol Chem. 261(1986)8816–8821

O81
Oxidační stres u pacientů s onemocněním ledvin- RAGE (receptor pro produkty pokročilé glykace) – polymorfismy, solubilní RAGE

Kalousová M., Jáchymová M., Mestek O., Tesař V., Zima T.
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky a Klinika nefrologie 1.LF UK a VFN Praha; VŠCHT Praha
marta.kalousova@seznam.cz

Produkty pokročilé glykace (AGEs) vzniklé vlivem oxidačního a karbonylového stresu se akumulují u pacientů se sníženou funkcí ledvin. Jejich některé patologické účinky jsou zprostředkovány přes receptor RAGE (receptor pro AGEs). Vazbou AGEs na RAGE je indukován oxidační stres a následně prozánětlivá odpověď. Solubilní RAGE (sRAGE) je přirozeně se vyskytující inhibitor AGE-RAGE interakce.
Sledovaný soubor tvořilo 261 pacientů s terminálním selháním ledvin léčených hemodialýzou sledovaných po dobu 40 měsíců a 100 zdravých kontrol. V podskupině 214 hemodialyzovaných nemocných byly vyšetřeny 4 polymorfismy genu pro RAGE (-429T/C a -374T/A na promotoru, 2184A/G na 8.intronu a Gly82Ser na 3.exonu). sRAGE byl stanoven imunochemicky metodou ELISA a další biochemické parametry (reaktanty akutní fáze, nutriční parametry) byly stanoveny standardními klinicko-biochemickými metodami.
637 pg/ml, p ± 1508 pg/ml vs 1758 ± sRAGE je významně zvýšen u pacientů s terminálním selháním ledvin léčených hemodialýzou ve srovnání se zdravými kontrolami (3427<0,001). Nejvyšší hodnoty sRAGE byly nalezeny -429 CC a 2184 GG variant genu pro RAGE. sRAGE negativně koreluje s reziduální diurézou (r=–0,193, p<0,05), s reaktanty akutní fáze fibrinogenem (r=-0,174, p<0,05) a orosomukoidem (r=–0,135, p<0,05) a s počtem leukocytů (r=-0,158, p<0,05). Na druhou stranu jeho hladina nesouvisí s přítomností diabetes mellitus, kardiovaskulárních onemocnění, nutričním stavem a mortalitou.
sRAGE u hemodialyzovaných pacientů je významně zvýšen vzhledem ke snížené funkci ledvin, která je silnou determinantou jeho koncentrace, a má negativní vztah k zánětu. Nejvyšší koncentrace sRAGE jsou ovlivněny geneticky. Naše studie neukázala význam sRAGE v prognóze nemocných.
Poděkování: Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM0021620807 a grantem Nadace Elpida. M. Kalousová je laureátkou stipendia LęOréal ČR pro ženy ve vědě.

O82
Volné radikály při rozvoji Alzheimerovy choroby

Skoumalová A., Wilhelm J.
Ústav lékařské chemie a biochemie, 2. LF UK v Praze
alice.skoumalova@lfmotol.cuni.cz

Alzheimerova choroba je nejčastější formou demence. V jejím rozvoji hrají významnou úlohu volné radikály. V mozku existuje více zdrojů nadměrné tvorby volných radikálů. Mezi nejdůležitější patří mitochondrie, jejichž abnormality byly nalezeny u Alzheimerovy choroby. Také enzymy NADPH oxidáza a NO syntáza produkují reaktivní sloučeniny. Dále koncentrace iontů železa je zvýšena v mozku u Alzheimerovy choroby. Amyloid ß, který se ukládá v senilních placích a v cévách, také generuje reaktivní sloučeniny.
Volné radikály iniciují proces peroxidace lipidů, v jehož důsledku vznikají peroxydační produkty podobné lipofuscinu - lipofuscinoidní pigmenty (LFP). Chemické složení těchto komplexních sloučenin není úplně známo, ale liší se u různých patologií a dá se charakterizovat pomocí fluorescenční analýzy. Dalším produktem radikálového napadení je tvorba oxidačních produktů proteinů. Analyzovali jsme mozkovou tkáň psů se senilní demencí Alzheimerova typu, kteří slouží jako spontánní model Alzheimerovy choroby. Zjistili jsme signifikantní nárůst LFP a karbonylů proteinů v porovnání s kontrolami. Také jsme prokázali sníženou koncentraci vitaminu E v mozkové tkáni, který jako antioxidant zabraňuje peroxydačním reakcím.
Aldehydické produkty peroxidace lipidů mohou difundovat z místa primárních radikálových reakcí a atakovat erytrocyty v krevním oběhu. Erytrocyty jsou velice citlivé k poškození volnými radikály, jelikož jejich cytoplasmatická membrána je bohatá na polynenasycené mastné kyseliny. Fluoresceční analýza LFP v membránách erytrocytů může odhalit specifické změny související s Alzheimerovou chorobou a sloužit k diagnostickým účelům. U psů s demencí jsme potvrdili přítomnost specifických LFP v erytrocytech. Také u lidských pacientů jsme prokázali nárůst LFP a změny fluorescenčních spekter v membránách erytrocytů. Vzhledem k tomu, že prozatím neexistuje spolehlivá diagnostická metoda založená na analýze krve, mohou být naše zjištění významné pro klinickou medicínu.

O83
Úloha NO v experimentálnej hypertenzii

Bernátová I., Pecháňová O.
Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic
Iveta.Bernatova@savba.sk

Nitric oxide (NO) is involved in many physiological and pathological processes, including neurotransmission, septic shock, heart failure and atherosclerosis. In the cardiovascular system, NO participates in regulation of vascular function and structure and thus in blood pressure control. NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) represents the most frequently used inhibitor of NO synthase. In our studies, adult Wistar rats were treated with L-NAME (20 or 40 mg/kg/day) for 4 week. While both L-NAME doses led practically to the same increase in blood pressure (up to 165 mm Hg), NO synthase activity in the aorta, left ventricle and brain were significantly lower in rats treated with 40 mg/kg/day of L-NAME vs. 20 mg/kg/day. Morphometric evaluation demonstrated a significant increase in myocardial fibrosis and elevated aortic wall thickness in both L-NAME groups, which were however more pronounced in the 40 mg/kg/day L-NAME group. Data indicate that NO deficiency rather than hemodynamic changes is responsible for structural changes in the heart and aorta. However, in contrast to these results, recently we have observed that 10-week treatment of rats with a low dose of L-NAME (1.5 mg/kg/day) resulted in paradoxical elevation of NO synthase activity in the left ventricle and aorta and improvement of vasorelaxation of the femoral artery while no changes of NO synthase activity were observed in the brain. Additionally, 7 weeks of L-NAME treatment in the dose of 40 mg/kg/day also elevated NO synthase activity in the left ventricle and aorta but reduced NO production was observed in the brain. In conclusion, our data suggest that despite a significant role of NO in the regulation of the cardiovascular system, the effects of L-NAME treatment may differ depending on the dose and duration of treatment as well as on the tissue investigated.
Supported by the VEGA grants Nos. 2/7064/28 and 2/6148/26 and APVT-51-018004.

O84
Biomodulačná aktivita prírodných polyfenolových látok

Muchová J.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava
jana.muchova@fmed.uniba.sk

Prírodné polyfenolové látky sú pre ľudí hlavným zdrojom antioxidantov. Majú rôzne biologické aktivity, s čím súvisí ich prospešný účinok na ľudské zdravie. Polyfenoly sú silné antioxidanty, chelatačné činidlá, majú antimutagénne vlastnosti, sú schopné redukovať agregáciu krvných doštičiek, zvyšovať biodostupnosť NO. Polyfenoly taktiež modulujú aktivitu a expresiu antioxidačných enzýmov – endotelovej a neurónovej NO syntázy, superoxid dismutázy, glutatión peroxidázy, MMP-9 metaloproteinázy, cyklooxygenázy.
V našom laboratóriu sledujeme biomodulačné účinky štandardizovaného polyfenolového extraktu Pycnogenolu® (Pyc), ktorý je izolovaný z kôry francúzskej prímorskej borovice Pinus pinaster. Je to zmes vo vode rozpustných flavonoidov a ďalších polyfenolov.
V in vitro pokusoch sme dokázali antiagregačné, protizápalové a antimutagénne účinky Pyc. Antiagregačné účinky sme potvrdili aj v animálnom pokuse po 7 týždňoch podávania Pyc. Zároveň sme potvrdili antioxidačné vlastnosti Pyc stanovením markerov oxidačného stresu v plazme a v tkanivách. V animálnych pokusoch sme zistili pozitívny vplyv Pyc na aktivitu a syntézu proteínu eNOS, nNOS a SOD.
V klinických štúdiách preukázalo podávanie Pyc pozitívny vplyv na klinický stav, ako aj na niektoré parametre oxidačného stresu u pacientov s diabetom mellitus, erektilnou dysfunkciou (ED), hyperkinetickou poruchou aktivity a pozornosti (ADHD) a osteoartrózou (OA). Podávanie Pyc malo pozitívny vplyv na lipidový profil u diabetikov, zlepšilo erektilnú funkciu u jedincov s ED, zlepšilo pozornosť a znížilo hyperaktivitu u detí s ADHD a potlačilo bolesť a meravosť kolenného kĺbu u pacientov s OA. Pyc mal tiež významný vplyv na niektoré parametre oxidačného poškodenia lipidov, nukleových kyselín, na antioxidačný stav organizmu a hladinu NO.
Možné mechanizmy biomodulačných účinkov polyfenolových látok budú diskutované.
Štúdie boli podporené VEGA grantami MŠ SR č. 1/4306/07, 1/4309/07, 1/4310/07, 1/0224/08 a občianskym združením Rozum a Zdravie.

Postery

P148
Protein and lipid oxidative damage in brain and heart with advancing age

Babusikova E., Hatok J., Jesenak M., Dobrota D., Kaplan P.
Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Institute of Medical Biochemistry, Martin, Slovak Republic; Department of Paediatrics, Martin Faculty Hospital, Martin, Slovak Republic
babusikova@jfmed.uniba.sk

Reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS/RNS) initiate oxidative damage that may by the most important contribution to ageing and ageing-related neurodegenerative and cardiovascular diseases. Our understanding of the role played by ROS/RNS in disease pathology and ageing is still insufficient. In the present study, we investigated the effect of ageing on oxidative damage of protein amino acid residues and lipids in brain and heart homogenate and mitochondria of 6- and 26-month-old Wistar rats. Oxidative modifications of brain and heart homogenate proteins were demonstrated by a loss of sulfhydryl content, accumulation of dityrosines and formation of protein conjugates with lipid peroxidation end products. There was a significant increase in thiobarbituric acid-reactive substances in brain homogenate and in levels of conjugated dienes in homogenates with advancing age. In brain mitochondria were observed only formation of protein conjugates with lipid peroxidation end products. Tryptofan oxidative modification and increased levels of dityrosine were observed in cardiac mitochondria, although levels of lysine conjugates and conjugated dienes were unchanged in heart mitochondria during ageing. The results of this study suggest different mechanism of oxidative modification in cell compartments and organs during ageing.
This work was supported by grants Angl/Slov/JLF and VEGA 1/0027/08.

P149
Antioxidační vlastnosti esterů silybinu s mastnými kyselinami

Purchartová K., Gažák R., Křen V.
Centrum biotransformace a biokatalýzy, Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha, Česká republika
k.a.m.i.k@centrum.cz

Flavonolignan silybin je majoritní složkou silymarinu, což je směs polyfenolických látek izolovaná ze semen ostropestřece mariánského (Silybum marianum). Silybin se využívá především jako hepatoprotektivum, ale je to také účinný antioxidant, ovlivňuje vylučování toxických látek z organismu a má uplatnění jako doplňková látka při chemoterapii nádorových onemocnění.
Biologická dostupnost a tedy i terapeutická účinnost silybinu je omezena jeho nízkou rozpustností ve vodě (430 mg.l-1). Modifikace silybinu spojené se zvýšením jeho rozpustnosti ve vodě zlepšují sice jeho biodostupnost, vždy jsou však doprovázeny podstatným snížením jeho antioxidační (anti-lipoperoxidační) aktivity. Pravděpodobným vysvětlením tohoto chování polárních derivátů silybinu je skutečnost, že silybin díky své amfifilní povaze působí převážně v místech fázového rozhraní voda – lipidová dvojvrstva, tedy na povrchu lipidických kompartmentů buněk. Zvýšení polarity molekuly silybinu tak vede ke snížení jeho afinity k těmto buněčným strukturám, což vede ke snížení aktivity takto modifikovaného derivátu oproti silybinu. Esterifikace silybinu mastnými kyselinami spojená se zvýšením jeho hydrofobity by naopak mohla vést k zesílení afinity těchto derivátů silybinu k povrchu biomembrán, což by mohlo vést ke zvýšení biologické aktivity těchto derivátů ve srovnání se silybinem. Pro zachování antioxidační aktivity zamýšleného acyl derivátu silybinu je nezbytné vést esterifikaci selektivně do poloh, které nejsou zodpovědné za tuto aktivitu. Jako nejvýhodnější se z tohoto hlediska jeví polohy 7-OH a 23-OH. V rámci této práce byla připravena série esterů silybinu substituovaných v polohách 7-OH a 23-OH mastnými kyselinami s různou délkou řetězce a byl studován vliv polohy substituce silybinu a délky řetězce mastné kyseliny na antioxidační (anti-lipoperoxidační) aktivitu.
Tato práce vznikla za podpory GA AV ČR (grant č. KJB400200701), MŠMT OC08049 a výzkumného záměru MBÚ AV ČR, v.v.i., č. AV0Z50200510.

P150
The effect of peripheral nerve injury on the level of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord

Dávidová A., Schreiberová A., Kolesár D., Maršala J., Lukáčová N.
Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Košice
davidova@saske.sk

Althought the effect of peripheral axotomy on the level of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) has been extensively investigated, the causality of neuronal damage in the spinal cord still considered controversial. In the endeavour to find the reason of changes in nNOS activity and nNOS immunoreactivity (nNOS-IR) in the spinal cord after nerve transections, the biochemical and immunocytochemical measurements have been made. nNOS activity and nNOS-IR were investigated in the rabbit lower lumbar spinal cord segments (L4-L5) after saphenous nerve transection and survival of experimental animals for 11 days. This study foccuses on the dorsal and ventral parts of L4-L6 spinal cord segments, because the dorsal part receives sensory inputs from the nerve through sensitive neurons localized in respective dorsal root ganglia, and ventral part consists of motor neurons of the above mentioned nerve. Peripheral axotomy caused significant increase in the level of nNOS protein in the dorsal part of L4-L5 segments on the contralateral side of the peripheral injury. We assume that the increase is caused predominantly by the damage of Ad thin myelinated fibers, carrying impulses of sensory modalities to CNS by tr. spinothalamicus lateralis. When the results were compared to control, the level of nNOS protein was higher in both the contra- and ipsilateral side in ventral part. Biochemical results were compared with immunohistochemical analyses. The present study suggests that the motor and sensitive reorganization of the spinal cord after peripheral nerve transection seems to be mediated by different mechanisms, including the modulation through the nNOS.
Supported by the VEGA Grant 2/0015/08 from the SAS and by the APVT 51-013002 and APVV 0314-06.

P151
Influence of salt stress on tomatoes

Šmídová Z., Izzo R.
Department of Chemistry and Agricultural Biotechnology, University of Pisa, Italy
zuzana.smidova@vscht.cz

The increase in reactive oxygen species production and resulting oxidative damage in plant cells occur as a response to abiotic stresses including drought, salt, extreme temperatures, etc. as well as to biotic stresses (pathogens). Among reactive oxygen species (ROS) the superoxide radical and hydrogen peroxide play an important role in mechanism of salt stress.
If the ROS production is not equilibrated by induction of antioxidant defence systems, the plants may suffer from harmful effects of oxidative stress, leading to lipid peroxidation, protein oxidation and oxidative DNA damage. Antioxidants are able to inhibit or slow down the oxidation of other molecules, thus stopping the propagation of oxidative chain reactions. To the most important antioxidants.belong ascorbic acid, glutathione and phenolic acids.
The effect of salt stress on antioxidant content and on cell redox status (NADPH/NADP+) was studied in the red-mature berries of several cultivars of tomato Lycopersicon esculentum Mill. Although this species is classified as moderately tolerant to salinity, there are differences among cultivars, as it was evident from the content of ascorbate, phenolic acids and cell redox status. The increase in the content of ascorbic acid in the berries showed this antioxidant as predominant defence system under conditions of elevated salinity. On the other hand, the pool of phenolic acids was depleted showing adverse effect of salinity on these antioxidants. The pool of NADPH contributed to the maintenance of the reduced ascorbate levels by its regeneration when required. It was proved that the antioxidant response of plants to stress conditions is not a result of individual antioxidant actions but of cooperation among them.
This work was supported by the Italian Ministry of University, Scientific and Technological Research (PRIN 2003) and by the University of Pisa, Italy (Fondi di Ateneo 2003).

P152
Štúdium účinku metylnikotínamidu na markery oxidačného stresu u potkanov s diabetes mellitus indukovaným streptozotocínom

Országhová Z., Liptáková A., Žitňanová I., Watala C., Muchová J., Ďuračková Z.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava SR; Ústav hemostázy a hemostatických ochorení, Lekárska Univerzita, Lodz, Poľsko
zuzana.orszaghova@fmed.uniba.sk

Hyperglykémia je zodpovedná za mikro- a makroangiopatiu spojenú s diabetes mellitus, ktorá zvyšuje riziko vývoja koronárneho, cerebrovaskulárneho ochorenia ako aj ochorenia periférnych artérií. Patológia vaskulárneho ochorenia u diabetikov zahŕňa abnormality endotelových buniek, buniek hladkého svalstva ciev a funkcie krvných doštičiek. Akumulácia produktov pokročilých fáz neenzýmovej glykácie proteínov (AGEs) hrá hlavnú úlohu v hrubnutí bazálnej membrány.
Nová antioxidačná látka – MNA (N1-metylnikotínamid chlorid), ktorá je derivátom nikotínamidu a nemá nežiadúce postranné účinky, sa intenzívne študuje aj ako látka s protizápalovými vlastnosťami (1,2). Tento účinok sa spája s vychytávaním reaktívnych foriem kyslíka, hlavne superoxidového aniónového radikálu a hydroxylového radikálu. MNA má iónový charakter (MNA+), čo mu umožňuje viazať sa na glykózaminoglykány na povrchu endotelu ciev, čím sa zvýši jeho lokálna koncentrácia. MNA týmto môže znižovať adhéziu prozápalových buniek a molekúl na povrchu endotelových buniek. Táto špecifickosť väzby MNA na povrch endotelových buniek môže mať potenciálne využitie v prevencii nadmernej zápalovej odpovede v diabetických cievach.
V tejto práci sme sa sústredili na účinok MNA u diabetických potkanov na niektoré markery oxidačného stresu – karbonyly proteínov (marker oxidačného poškodenia proteínov), peroxidy lipidov (marker oxidačného poškodenia lipidov), ako aj AGE produkty ako marker glykoxidačného poškodenia proteínov. Zároveň sme stanovili celkový antioxidačný status (TEAC) v plazme experimentálnych zvierat.

(1) Jonas WB, Rapoza CP, Blair WF. The effect of niacinamide on osteoarthritis: a pilot study. Inflamm Res. 1996;45:330-334.
(2) Musfeld C, Biollaz J, Belaz N, Kesselring UW, Decosterd LA. Validation of an HPLC method for the determination of urinary and plasma levels of N1-methylnicotinamide, an endogenous marker of renal cationic transport and plasma flow. J Pharm Biomed Anal. 2001;24:391-404.

P153
Ochranná úloha hyperkapnie před radikálovým poškozením

Skoumalová A., Wilhelm J.
Ústav lékařské chemie a biochemie, 2. LF UK v Praze
alice.skoumalova@lfmotol.cuni.cz

Mnoho studií ukázalo, že vystavení organismu hypoxii indukuje radikálové poškození v různých tkáních. Mechanismus radikálových reakcí zahrnuje peroxidaci membránových lipidů. Koncové produkty, tzv. lipofuscinoidní pigmenty (LFP), fluoreskují a pomocí fluorescenční analýzy lze odvozovat změny v jejich množství i složení. Vystavení potkanů 4 denní hypoxii (10% O2) způsobuje 9-ti násobné zvýšení hladiny LFP v erytrocytech. Tomuto nárůstu bylo zabráněno, když zvířata současně dýchala vyšší koncentrace CO2 (4,3% CO2). Proto jsme se zaměřili na studium mechanismů ochranného efektu CO2 na modelu izolovaných membrán erytrocytů in vitro. Peroxidace lipidů byla zahájena inkubací membrán s ionty železa a askorbátem ve dvou pufrech, jeden obsahoval Tris a druhý bikarbonát. Produkce malonaldehydu jako prekurzoru LFP byla silně inhibována v bikarbonátovém pufru. Podobně tvorba LFP byla nízká v přítomnosti bikarbonátu. Tyto výsledky ukazují, že ochranná úloha hyperkapnie zahrnuje přímou interakci CO2 s radikálovými reakcemi.

Tato studie je podpořena grantem MŠMT ČR č. 2B06088.

Přednášky

O85
Mastné kyseliny – strukturní součást lipidů

Tvrzická E.
Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
eva.tvrzicka@vfn.cz

Mastné kyseliny (FA) jsou strukturní součástí lipidů, které spolu s bílkovinami a uhlovodany představují základní stavební kameny živé hmoty. Jsou to buď nasycené nebo nenasycené karboxylové kyseliny s uhlíkovým řetězcem od 2 do 36 atomů. U vyšších živočichů a rostlin dominují FA se 16 a 18 uhlíkovými atomy, FA s řetězcem kratším než 14 a delším než 22 uhlíkových atomů představují minoritní část. Většina FA má sudý počet atomů uhlíku. Přibližně polovina FA je nenasycených, s 1-6 dvojnými vazbami. Vícenenasycené FA (PUFA) jsou charakterisovány pentadienovým uspořádáním dvojných vazeb.
Mastné kyseliny mají v živých organismech řadu úloh. Jako součást fosfolipidů tvoří základní strukturu všech buněčných membrán, v triglyceridech představují významný zdroj energie; v tukové tkáni slouží jako zásoba energie i tepelná isolace. Nenasycené FA s 18-20 atomy uhlíku jsou prekursory prostaglandinů, leukotrienů a tromboxanů, které mají regulační vlastnosti s autokrinními i parakrinními účinky. Mastné kyseliny jsou rovněž ligandy několika nukleárních receptorů, které kontrolují řadu metabolických pochodů na subcelulární úrovni. Kovalentní modifikace proteinů mastnými kyselinami umožňuje jejich inkorporaci do membrán. Mastné kyseliny s 20 a 22 uhlíkovými atomy jsou prekursory dalších autakoidů – resolvinů, lipoxinů a neuroprotektinů. Hydroxy FA jsou aktivátory některých nukleárních faktorů a jsou zodpovědné za expresi prozánětlivých cytokinů a adhesních molekul. Řada patologických stavů je spojena s nedostatkem PUFA a zvýšeným obsahem nasycených FA. Vícenenasycené FA jsou využívány jako dietní doplňky i k terapeutickým účelům.
Podporováno výzkumným záměrem MSM 0021620820 a MSM 0021620807.

O86
n-3 PUFA a chemické deriváty dokosahexaenové kyseliny v prevenci a léčbě obesity a porušené glukosové tolerance u myši na vysokotukové dietě

Rossmeisl M., Jílková Z., Jeleník T., Hensler M., Mohamed-Ali V., Bryhn M., Berge K., Holmeide A.K., Kopecký J.
Institute of Physiology, AS CR, Prague, Czech Republic; University College London, UK; Pronova BioPharma AS, Lysaker, Norway
rossmeis@biomed.cas.cz

n-3 polyunsaturated fatty acids, especially eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (DHA), exert beneficial metabolic effects while preventing obesity and insulin resistance in animals fed high-fat diets. However, their efficiency in reverting established obesity and insulin resistance is relatively low. By using a model of high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice, we determined whether alpha-substituted DHA-derivatives could exert a higher efficacy as anti-obesity and anti-diabetic agents, compared to DHA. Three-month-old mice were given either a corn oil-based high-fat diet (cHF; lipids ~35% weight/weight) or cHF-based experimental diets, in which 1.5% of lipids was replaced with DHA-derivatives (Substances 1-4). Obesity, hyperlipidemia, impaired glucose homeostasis and adipose tissue inflammation were induced by cHF diet in the control mice after 4 months of feeding. Substance 2 (@-ethyl DHA ethyl ester), the most efficient DHA-derivative, prevented weight gain (63% of cHF-fed controls), improved glucose intolerance (area under the curve; ~67% of cHF), reduced adipose tissue inflammation, and lowered plasma insulin, triacylglycerols, and non-esterified fatty acids (9, 47, and 81% of cHF, respectively). Substance 2 also reduced obesity and reverted glucose intolerance in obese mice. Thus, Substance 2 represents a novel compound for the treatment of obesity and associated metabolic disturbances.

O87

The effect of dietary EPA/DHA ratio and dosage on the development of obesity and metabolit disorder in mice fed a high-fat diet

Jeleník T., Rossmeisl M., Kůs V., Kopecký J.
Institute of Physiology, AS CR, Prague, Czech Republic
jelenikt@seznam.cz

n-3 polyunsaturated fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), prevent development of obesity, hyperlipidemia and insulin resistance in rodents fed high-fat diets. Epidemiological studies suggest similar beneficial effects in human populations. In this study, we explored the effect of different doses of EPA and DHA on the development of obesity and metabolic disorder in mice fed a high-fat diet. Six groups (n = 10) of adult C57BL/6N male mice were fed for 16 weeks with a standard low-fat, control high-fat (lipids ~ 35% weight/weight) and 4 experimental diets where 5 or 15 % of dietary lipids were replaced with the EPA/DHA concentrate and the ratio of EPA to DHA was either 10:50 or 45:10. Body weight gain (BWG) and food consumption were monitored weekly. Fed and fasted blood was sampled after 2, 8 and 16 weeks of differential feeding. At the end of the experiment, an intraperitoneal glucose tolerance test was performed and plasma and tissue depots were collected. There was no difference in the average food consumption during the whole experiment. Mice fed with 15% EPA/DHA had a significantly decreased BWG (by 20 %), while diets with 5% EPA/DHA did not affect BWG compared to control mice fed a high-fat. Fasted blood glucose levels correlated positively with the BWG. All experimental diets significantly decreased the level of plasma triacylglycerols already after 2 weeks of feeding compared to control high-fat diet. However, the hypolipidemic effect of the diet with 15% EPA/DHA and lower EPA to DHA ratio diminished after a prolonged feeding (8 weeks). The levels of NEFA tended to decrease in all experimental groups compared to the control high-fat group. Our results suggest dose-dependent protective effects of dietary EPA/DHA in the development of obesity, hyperglycemia and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet, while a higher EPA to DHA ratio supports the maintenance of hypolipidemic effect during the long-term feeding.

O88

Influence of LC-PUFA intake during perinatal period on metabolism of skeletal muscle and possible programming of energy metabolism

Medříková D., Janovská P., Jílková Z., Rossmeisl M., Kopecký J.
Department of Adipose Tissue Biology, Institute of physiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic
medrikova@biomed.cas.cz

Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) are essential for normal development. During pregnancy, fatty acids are transported from maternal circulation across the placenta and play an important role in the regulation of many cell functions including regulation of gene expression. Thus intake of LC-PUFA during perinatal period could influence the development of metabolism and possibly cause persistent changes into adulthood. This study was designed to elucidate acute and lasting effects of intake of dietary fish oil during pregnancy and lactation on offspring metabolism and to specify the role of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the postnatal induction of uncoupling protein 3 (UCP3) and other genes involved in energy metabolism in muscle. Adult C57BL/6N female mice were divided into two groups that were fed non-purified low fat diet (6% fat, wt/wt) that differed in lipid composition. One diet contained 6% fat based on soybean oil (Chow6) whereas in the other was 5% of total lipids content replaced by n-3 PUFA concentrate (Chow6-F2). Mice remained on the diets during pregnancy and lactation. After weaning After weaning pups were randomly divided and put on high fat (HF, 35% fat, wt/wt) or remained on chow diet. Milk consumption and lipid profile of milk were assessed. Gene expressions in oxidative (soleus)and mixed (gastrocnemius) muscles using qRT-PCR and plasma lipid markers were quantified. We have demonstrated that n-3 LC-PUFA have no effect on milk production by dams and milk consumption by pups. Milk from Chow6-F2 group contains significantly higher amount of EPA and DHA. Expression of UCP3 in male gastrocnemius muscle was higher in group fed HF diet, whereas in soleus muscle there were no obvious changes. The situation in females was completely opposite. Sexual dimorphism in the activation of UCP3 and other genes involved in energy metabolism by high fat diet was discovered. Interaction between muscle type and gender was demonstrated.

O89

Zvýšená aktivita lysozomální lipázy podmiňuje vznik inzulínové rezistence v játrech u dietně navozené steatózy

Cahová M., Vavřínková H., Daňková H., Marková I., Kazdová L.
Institut klinické a experimentální medicíny, Oddělení metabolismu diabetu PEM
moca@medicon.cz

Vysoká prevalence výskytu inzulínové rezistence (IR) u pacientů s jaterní steatózou implikuje kauzální spojitost těchto jevů. Cílem naší studie je identifikace klíčových dějů intrahepatocytárního metabolismu triacylglycerolů (Tg), které mohou vést k poruše přenosu inzulínového signálu.
Uspořádání pokusu: Dospělí samci hereditárně hypertriglyceridemických potkanů byli krmeni standardní (SD) nebo vysokotukovou (VTD, 60 kal% sádla) dietou po dobu 14 dnů. 16 hod před pokusem byla části zvířat v každé skupině odebrána potrava, část měla k potravě volný přístup a 40 min před dekapitací jí byl podán inzulín i.p. 6U/kg.
Výsledky: 14 dní podávání VTD vedlo k navození glukózové intolerance prokázané jako zvýšení lačné insulinemie a zhoršení OGTT. U VTD skupiny se zvýšil obsah Tg v játrech (20,8±2,3 vs 3,7±0,5 μmol/g), stoupl obsahu diacylglycerolu (DAG, 46,5±1,2 vs 41±0,8 nmol/g) a snížila se inzulínem stimulovaná syntéza glykogenu (175±18,8 vs 360±45 mol glukózy/g). Ve skupině krmené VTD jsme zjistili zvýšenou aktivitu kyselé lysozomální lipázy (LAL) měřenou podle uvolňování mastných kyselin a DAG z endogenních Tg i z exogenního substrátu při pH=4,5. V játrech HHTg potkanů krmených VTD jsme prokázali sníženou fosforylaci Akt kinázy a mTOR kinázy po stimulaci inzulínem a zvýšenou aktivaci PKCε ve srovnání se skupinou krmenou SD.
Závěry: V hepatocytech probíhá kontinuální koloběh lipolýzy a reesterifikace, ve kterém má klíčovou úlohu LAL. Steatóza je spojena se zvýšenou aktivitou LAL, s vyšším intracelulárním obratem Tg a vyšší produkcí DAG, který je aktivátorem PKCε. PKCε se považuje za jeden z hlavních faktorů přispívající k navození IR jater.V játrech potkanů krmených VTD jsme prokázali zvýšenou aktivitu PKCε a současné snížení citlivosti k inzulínu na úrovni aktivace Akt a mTOR kinázy. Naše výsledky ukazují, že zvýšená produkce DAG, která je důsledkem stimulace aktivity LAL, může představovat chybějící spojovací článek mezi akumulací Tg v játrech a jaterní IR.

O90

Věkem indukované změny sekrece adipocytokinů, antilipolytického účinku inzulinu a tkáňové inzulinové rezistence u modelů metabolického syndromu

Kazdová L., Hubová M., Cahová M., Pravenec M.
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha; Fyziologický ústav AV ČR v.v.i., Praha
lukz@ikem.cz

Mechanizmy, které se uplatňují ve zhoršení inzulinové senzitivity periferních tkání a v dalších poruchách asociovaných s přibývajícím věkem u metabolického syndromu nejsou dosud objasněny. Cílem studií bylo sledovat u experimentálních modelů metabolického syndromu věkem indukované změny sekrece adiponektinu a rezistinu ve vztahu k poruchám inzulinové senzitivity a ektopického ukládání lipidů. Pokusy byly provedeny u dospělých samců a) u neobesních hypertriglyceridemických potkanů (HHTg) ve stáří 4 a 18 měsíců, b) u obesních potkanů kmene Zucker a c) transgenních SHR potkanů s exprimovaným rezistinem pod promotorem Ap2. Kontrolní skupiny tvořili neobézní potkani odpovídajícího věku a kmene. Koncentrace adiponektinu a rezistinu byly stanoveny metodou ELISA (B-Bridge, Inc., USA; Linco,USA. Rezistence kosterních svalů a tukové tkáně k účinku inzulinu byla sledována podle inzulinem stimulované inkorporace 14C-U-glukózy do glykogenu a lipidů. U obézních potkanů byla vyšší váha tukového tělesa, hypertriglyceridemie a téměř úplná rezistence tukové a svalové tkáně k účinku inzulinu spojena s nízkými hladinami adiponektinu a s vyššími koncentracemi rezistinu. Naproti tomu u neobézních HHTg a kontrolních potkanů nebyly koncentrace adiponektinu ani rezistinu rozdílné ve stáří 4 ani 18 měsíců, přestože HHTg potkani měli vyšší triglyceridemii a zhoršenou insulinovou senzitivitu svalové a tukové tkáně a zvýšené koncentrace triglyceridů v kosterních svalech a v játrech. U obou těchto skupin došlo v průběhu stárnutí ke stejnému poklesu sérových koncentrací adiponektinu a k vzestupu koncentrací rezistinu. Pro úlohu rezistinu svědčí i výsledky u 16 měsíců starých transgenních potkanů se zvýšenou expresí rezistinu, která byla asociována se zvýšenou triglyceridémií, hyperinsulinémií, zhoršenou glukosovou tolerancí a téměř úplnou resistencí tukové tkáně k účinku insulinu. Výsledky naznačují uplatnění rezistinu a adiponektinu v mechanismu věkem indukované inzulinové rezistence.

O91
Significance of AMP-activated protein kinase for the effect of leptin

Jilkova Z., Kus V., Medrikova D., Janovska P., Pavelka S., Kopecky J.
Department of Adipose Tissue Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic; Department of Radiometry, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.
zuzana.jilkova@email.cz

Leptin is a hormone secreted by adipocytes in proportion to fat stores that plays a major role in regulating energy homeostasis by decreasing food intake and increasing energy expenditure. Leptin stimulates the oxidation of fatty acids and the uptake of glucose and prevents the accumulation of lipids in nonadipose tissue. Rodents with diet-induced obesity and most obese humans are resistant to the effects of leptin. Previous studies demonstrated that leptin modulates the activity of the AMP-activated protein kinase (AMPK) by stimulation of phosphorylation and activation of the alpha2 catalytic subunit of AMPK and that the AMPK is therefore a key regulator of the effect of leptin on food intake and fatty acid oxidation. The aim of the study was to investigate the significance of AMPK for the leptin effect in post-weaning mice using alpha2 AMPK KO mice. Male alpha2 AMPK KO mice and B6 mice were fed standard chow, housed one per cage and maintained on 30 °C. Fourteen days after weaning were injected with saline (control) or leptin intraperitoneally (3mg/kg). Food intake of individually housed mice was assessed per 24hours period. AMPK and ACC activity was measured in gastrocnemius muscles and plasma leptin levels were determined by RIA kits. The metabolic rate of mice was assessed by indirect calorimetry. We have demonstrated that leptin decreased respiratory exchange ratio (indicating increased fatty acid oxidation) in B6 mice, however there were no differences in alpha2 AMPK KO mice. We have observed the anorexigenic effect of leptin in B6 mice, but this effect was absent in alpha2 AMPK KO mice. However, alpha2 AMPK KO mice injected with leptin still tended to eat less than alpha2 KO mice injected with saline.
Our results indicate that absence of alpha2 AMPK subunit leads to disruption of signaling pathway for leptin suggesting that alpha2 AMPK subunit is necessary for the effect of leptin.

O92
Regulace lipolysy v tukové tkáni: sledování in vivo pomocí mikrodialyzy

Štich V.
Oddělení tělovýchovného lékařství, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze
vladimir.stich@lf3.cuni.cz

Plasmatické neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) nejsou pouze energetickým substrátem, ale hrají důležitou roli v patogenezi insulinové resistence a regulaci celé řady metabolických procesů. Dostupnost plasmatických NEMK je určena především jejich uvolňováním z tukové tkáně v procesu lipolyzy. Lipolyza v tukové tkáni je regulována řadou hormonálních, parakrinních a autokrinních signálů. Jejich absolutní velikost a relativní příspěvek k regulaci se liší v různých fyziologických situacích: výživa a tělesná zátěž jsou hlavními fyziologickými proměnnými, které regulaci lipolyzy ovlivňují. Lipolyza je typicky stimulována při tělesné zátěži a po lačnění a suprimována ve stavu postprandiálním. Pomocí mikrodialyzy a "lokální farmakologie" lze sledovat příspěvek jednotlivých hormonů k regulaci změn lipolyzy ve výše uvedených situacích in vivo. Výsledky ukazují, že během tělesné zátěže se v regulaci lipolyzy uplatňuje duální (stimulační a současně inhibiční) působení katecholaminů, stimulační působení atriálního natriuretického faktoru a růstového hormonu a inhibičn působení insulinu. Regulační příspěvek jednotlivých hormonů je modulován výživou. U obesních subjektů je regulace lipolyzy změněna a tvoří tak součást obrazu celkově snížené metabolické flexibility charakteristické pro obezitu: otázkou zůstává do jaké míry lze tuto sníženou flexibilitu léčbou obezity korigovat.
Práce presentované v tomto sdělení byly podporovány grantem IGA MZ NR 9161-3-2007 a grantem GAČR 303/07/0840.

O93
Regulacia metabolizmu neutralnich lipidov u kvasinek S. cerevisiae

Mrózová Z., Czabany T, Špaňová M., Valachovič M., Hapala I.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji
ivan.hapala@savba.sk

Enzýmy podieľajúce sa na syntéze a mobilizácii neutrálnych lipidov sú evolučne konzervované u všetkých eukaryotických organizmov. Mechanizmy, ktorými je kontrolovaná aktivita týchto enzýmov a tým aj hladina zásobných lipidov, sa však u jednotlivých organizmov líšia. Syntáza mastných kyselín (FAS) je u cicavcov kľúčový enzým v regulácii ukladania tukových zásob a jej aktivita je nevyhnutná pre tvorbu tukových teliesok pri diferenciácii adipocytov. Naše výsledky ukazujú, že syntáza mastných kyselín môže hrať podobnú úlohu aj v kvasinke S. cerevisiae. Vyradenie FAS aktivity špecifickým inhibítorom alebo mutáciou blokuje tvorbu triglyceridov v aeróbnych kvasinkách aj pri nadbytku externých mastných kyselín v rastovom médiu. Naše výsledky ukazujú, že porucha v tvorbe triglyceridov nesúvisí s defektom v príjme mastných kyselín, s poruchou v aktivite niektorého z enzýmov s triacylglycerol syntázovou aktivitou (Dag1p, Lro1p, Are1p/Are2p) ani so zvýšenou hydrolýzou triacylglycerolov. Závislosť tvorby triglyceridov na intracelulárnej syntéze mastných kyselín je pritom špecifická pre aeróbne kultivované bunky a nevyskytuje sa u anaeróbnych a hem deficitných kvasiniek. Hladina triglyceridov je kontrolovaná výrazne odlišnými mechanizmami v porovnaní s druhou formou zásobných lipidov – sterol estermi. Komplexné mechanizmy kontroly metabolizmu neutrálnych lipidov u kvasinky S. cerevisiae tak odrážajú potrebu adaptácie na meniace sa podmienky prostredia.
Práca bola podorovaná grantom VEGA 2/7135/27.

O94
Kvasinková fosfolipáza C (Pgc1) sa podieľa na kontrole množstva fosfatidylglycerolu v mitochondriách.

Šimočková M., Holič R., Tahotná D., Patton-Vogt J., Griač P.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji; Department of Biological Sciences, Duquesne University, Pittsburgh, PA
Peter.Griac@savba.sk

Fosfatidylglycerol je nielen metabolickým prekurzorom kardiolipínu, dôležitého mitochondriálneho aniónového fosfolipidu, ale sám osebe plní niektoré významné funkcie. Je napríklad esenciálnym lipidom tylakoidov aeróbnych fotosyntetizujúcich organizmov a tiež je dôležitou súčasťou plúcneho surfaktantu cicavcov.
Produkt otvoreného čítacieho rámca YPL206c (PGC1) kvasinky Saccharomyces cerevisiae vykazuje významnú homológiu s bakteriálnymi a cicavčími glycerofosfodiester fosfodiesterázami. Dizrupcia génu PGC1 má za následok akumuláciu fosfatidylglycerolu v kvasinkových bunkách rastených bez prítomnosti inozitolu, významnej regulačnej molekuly biosyntézy fosfolipidov. Ukázali sme, že táto akumulácia fosfatidylglycerolu vzniká v dôsledku inaktivácie degradačnej dráhy, ktorá je v štandardnom kmeni zodpovedná za odstránenie prebytočného fosfatidylglycerolu. Pgc1 proteín plní pritom s najväčšou pravdepodobnosťou úlohu fosfatidylglycerol špecifickej fosfolipázy C. Pomocou označenia Pgc1 proteínu glutation S transferázou (GST) a následnou subcelulárnou frakcionáciou sme lokalizovali GST-Pgc1p v mitochondriách a lipidových partikulách. Fosfolipázovú aktivitu voči fosfatidylglycerolu vykazovali ovšem iba mitochondriálne frakcie.
Tieto výsledky poukazujú na existenciu nového regulačného mechanizmu kardiolipínovej biosyntetickej dráhy. V rámci tohto mechanizmu je prebytočný fosfatidylglycerol odstraňovaný pôsobením fosfatidylglycerol špecifickej fosfolipázy C (Pgc1p). Ďalšie štúdium bude zamerané na purifikáciu a charakterizáciu enzymatickej aktivity Pgc1p a na analýzu jeho úlohy v mitochondriálnej bioenergetike.
Práca vznikla vďaka podpore VEGA grantu 2/7136/27.

Postery

P154
Genetická deficience v renální expresi Cd36 zvyšuje krevní tlak u spontánně hypertenzních potkanů

Pravenec M., Zídek V., Landa V., Mlejnek P., Kazdová L., Viklický O., Kurtz T.W.
Fyziologický ústav AV ČR, Praha; IKEM, Praha; Kalifornská univerzita, San Francisko
mlejnek@biomed.cas.cz

Spontánně hypertenzní potkani kmene SHR nesou deleční variantu Cd36 genu, která podmiňuje lokusy kvantitativních znaků ovlivňující metabolizmus lipidů a glukózy. V této studii jsme analyzovali hypotézu, že Cd36 také reguluje krevní tlak (1) pomocí kvantitativní analýzy renální exprese Cd36 u transgenních linií a (2) pomocí transplantačních experimentů s transgenními a kongenními ledvinami. Ze 4 SHR transgenních linií, exprimujících Cd36 gen pod kontrolou EF-1alfa promotoru, jen jedna vykazovala významnou renální expresi Cd36 transgenu a snížení krevního tlaku, zatímco zbylé 3 s nízkou či nedetekovatelnou expresí transgenu, měly krevní tlak podobný jako SHR kontroly. Bilaterálně nefrektomovaní SHR.BN-Cd36 kongenní přijemci, s transplantovanými ledvinami od SHR potkanů, vykazovali vyšší krevní tlak ve srovnání s příjemci s transplantovanými transgenními nebo kongenními ledvinami. Je známo, že Cd36 reguluje aktivitu endoteliální syntázy oxidu dusnatého v ledvině pomocí myristylace, která je nezbytná pro její membránovou lokalizaci a funkci. Tato hypotéza je podporovaná významně nižšími koncentracemi cGMP v tkáni ledvin kmene SHR ve srovnání s SHR transgenním a kongenním kmenem (0.54Ī0.08 vs. 0.91Ī0.09 and 0.83Ī0.08 pmol/g, P=0.007). Naše výsledky prokazují úlohu Cd36 v ledvině při regulaci krevního tlaku ovlivněním aktivity endoteliální syntázy oxidu dusnatého.

P155
Mastné kyseliny v dietních doplňcích

Staňková B., Tvrzická E., Krátká J., Vecka M., Žák A.
Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta; Všeobecná fakultní nemocnice
barsta@atlas.cz

Dietní suplementy s rybím či rostlinným olejem jsou často využívány jako podpůrné preparáty při léčbě řady chorob. Tyto oleje jsou také zastoupeny v enterální a parenterální výživě, kde mají význam v podpůrné léčbě kritických stavů. Jejich léčebný účinek, který zajišťují vícenenasycené mastné kyseliny (PUFA) řady n-3 a n-6, závisí na obsahu těchto kyselin v jednotlivých preparátech. Exogenní PUFA mají antiatherogenní a antitrombotický efekt, opačný účinek mají nasycené mastné kyseliny. Při výběru preparátu je vhodné znát zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Naším cílem bylo zjistit zastoupení PUFA v dietních suplementech obchodní sítě.
PUFA n-6: mateřskou kyselinou je kyselina linolová (LA), důležitými metabolickými produkty jsou kyselina gama-linolenová (GLA) a arachidonová (AA). Zdrojem jsou semena většiny rostlin. AA je hlavním prekursorem eikosanoidů. PUFA n-6 jako ligandy PPAR-gama zvyšují sensitivitu insulinu, ovlivňují distribuci tuku a velikost adipocytů. Dietní doplňky využívají jako zdroj LA hlavně pupalkový olej (63-74 mol%) a sojový lecitin (54-60 mol%), vysoký obsah GLA mají semena brutnáku (22 mol%).
PUFA n-3: mateřskou kyselinou je kyselina alfa-linolenová (ALA), hlavními metabolickými produkty jsou kyseliny eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA). Zdrojem ALA jsou semena a listy některých rostlin. Její konverse na 20-22 uhlíkaté metabolity je mnohem efektivnější u mořských živočichů než u člověka. Jako ligandy PPAR-alfa PUFA n-3 zvyšují thermogenesi a snižují lipogenesi. Jejich imunomodulační aktivita je pravděpodobně spojena s potlačením aktivace T-lymfocytů, exprese cytoadhesních a prozánětlivých molekul, a se změnou synthesy eikosanoidů. Doplňky s rybím olejem mají velké rozdíly v obsahu účinných složek (EPA 2-64 mol%, DHA 2-25 mol%), které jsou určeny druhem ryby jako zdroje oleje. Vysokého obsahu těchto složek lze dosáhnout pouze chemickou úpravou.
Podporováno výzkumným záměrem MSM 0021620820.

P156
Změny ve složení mastných kyselin v lipoproteinech u různých poruch výživy

Macášek J., Tvrzická E., Staňková B., Vecka M., Žák A.
Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
JMacasek@seznam.cz

Poruchy výživy, ať již ve smyslu malnutrice nebo nadměrného příjmu potravy, mají významně porušen metabolismus lipidů a mastných kyselin (FA). Na jejich změnách se mohou podílet různé patogenní faktory či jejich kombinace: snížený přísun esenciálních FA, -oxidací a lipoperoxidací. Dochází také ke změně koncentrace cholesterolu v séru a jeho distribuce v lipoproteinech (LP). Cílem studie bylo sledovat změny parametrů lipidového metabolismu a profilů FA u pacientů s uvedenými poruchami výživy.porucha konverse kyseliny linolové (LA) a alfa-linolenové (ALA) na metabolity, zvýšený požadavek vícenenasycených FA pro synthesu fosfolipidů (PL) a eikosanoidů, zvýšené odbourávání FA .
Vyšetřili jsme 35 pacientů s mentální anorexií (AN) jako příkladu prostého hladovění, 30 pacientů s proteino-energetickou malnutricí (PEM) jako příkladu stresového hladovění, a 45 pacientů s metabolickým syndromem (MS) jako příkladu nadměrného příjmu potravy. Každá skupina měla vlastní kontrolní skupinu zdravých osob odpovídajícího věku a pohlaví.
U skupiny AN jsme zjistili zvýšené koncentrace celkového (TC) i HDL-cholesterolu (HDL-C), triglyceridů (TG) a neesterifikovaných FA, u PEM byly koncentrace TC, HDL-C i LDL-C sníženy. Skupina MS měla zvýšené koncentrace TG a snížené u HDL-C. Všechny skupiny vykazovaly ve všech lipidových třídách – esterech cholesterolu, TG a PL zvýšené zastoupení kyseliny palmitolejové, která je markerem liponeogenese, a snížený obsah kyseliny linolové, který byl zřejmě důsledkem sníženého příjmu i zvýšené utilisace.

Podporováno výzkumným záměrem MSM 0021620820.

P157
Časná odpověď Bacillus subtilis na etanolový stres

Šemberová L., Seydlová G., Halada P., Svobodová J.
Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze;
Mikrobiologický ústav AVČR v.v.i.
gabina.sey@seznam.cz

Toxický účinek etanolu na bakterii Bacillus subtilis byl testován na úrovni cytoplazmatické membrány. Etanol přítomný v kultivačním médiu ve 3 % koncentraci zpomaluje růstovou rychlost z c = 3,5.h-1 na c = 2,4 h-1. Po 30 minutách růstu s etanolem byly z bakterií izolovány cytoplazmatické membrány a podrobeny komplexní biochemické analýze fosfolipidových tříd (TLC), mastných kyselin (GC/MS) a proteinů (2D PAGE). Paralelně byl testován fyzikální stav membrány buněk pomocí ustálené anizotropie fluorescence (r) sond DPH a TMA-DPH. V lipidové komponentě byly v časné fázi etanolového stresu zaznamenány jen drobné kvantitativní změny. Celková syntéza membránových proteinů se výrazně zpomalila, jak dokládá snížená míra inkorporace [35S]-methioninu do membránových proteinů, přesto však etanol selektivně aktivoval v membráně syntézu 2 nových proteinů a u 4 dalších proteinů byly zjištěny vyšší hladiny. Uvedené proteiny identifikované metodou MALDI-TOF patří do rodiny obecných stresových proteinů (GSP). Teplotní závislost rDPH a rTMA-DPH vypovídá o vyšší tekutosti membrán izolovaných z bakterií vystavených 30 min etanolu v porovnání s membránami kontrolními; a to jak na povrchu, tak v nitru membrány. Vysvětlení nabízí snížený poměr hmotnosti protein : lipid v membráně, který vyplývá z rozdílů v rychlosti značení obou membránových komponent radioaktivními prekurzory.

Ochrana bakterie v časné fázi působení etanolu tedy spočívá v produkci vybraných proteinů obecné stresové odpovědi, jejichž funkcí se předpokládá zvýšená opravná kapacita buňky.

P158
Anionické fosfolipidy v biogenéze mitochondrií Kluyveromyces lactis

Obernauerová M., Polakovičová V., Tichá E.
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie
obernauerova@fns.uniba.sk

Základnou úlohou mitochondrií vo fyziologii eukaryotických buniek je tvorba bunkovej energie. Kvasinky Kluyveromyces lactis patria k petite-negatívnym druhom, neschopným postrádať mitochondriálny genóm a tým aj komponenty respiračného reťazca a oxidačnej fosforylácie. Špecifické mutácie (mgi) v génoch ATP1, -2, -3 kódujúce a-, b-, a g- podjednotky F1-ATPázy potláčajú r0 letalitu buniek a umožňujú vznik životaschopnej populácie. Kardiolipín a fofatidylglycerol (CL, PG) sú anionické fosfolipidy vyskytujúce sa výlučne vo vnútornej membráne mitochondrií. Ich absencia spôsobená pgs1 mutáciou je pre K. lactis letálna. Na základe poznatkov o energetickom pozadí mgi mutácií a úlohe CL v energetickom metabolizme, bol v našom laboratóriu pripravený dvojitý mutant atp2.1/pgs1, s cieľom študovať vplyv genetickej interakcie oboch mutácií na fyziologické vlastnosti kvasiniek K. lactis. Analýze bola podrobená schopnosť mutanta rásť na skvasitelných a neskvasitelných substrátoch, termosenzitivita, citlivosť ku killer toxínom, citlivosť k rôznym typom metabolických inhibítorov ovplyvňujúcich mitochondriálne funkcie, syntézu bunkovej steny a cytoplazmatickú, resp. mitochondriálnu proteosyntézu. Naše výsledky naznačujú, že atp2.1/pgs1 mutant, ktorému chýbajú anionické fosfolipidy sa prejavuje na rozdiel od atp2.1 mutanta a divého kmeňa zníženou citlivosťou voči látkam interferujúcim s oxidačnou fosforyláciou, čo môže súvisieť s možnou participáciou CL pri zabezpečení mitochondriálneho membránového potenciálu kvasiniek K. lactis.
Práca je financovaná z grantov VEGA 1/3246/06 a VEGA 1/0078/08.

P159
Antiadipogenní účinky konjugované kyseliny linolové u experimentálního modelu metabolického syndromu

Malínská H., Maxová M., Hubová M., Kazdová L.
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
haml@ikem.cz

Úvod: Konjugovaná kyselina linolová (CLA) – n-6 mastná kyselina je obsažena v mase a mléce přežvýkavců a v některých studiích byly pozorovány její antiadipogenní, antiaterogenní a protizánětlivé účinky. Mechanizmy jejího působení ani účinky u osob s metabolickým syndromem nejsou objasněny. Cílem naší studie bylo sledovat vliv CLA na svalovou a tukovou tkáň u experimentálního modelu metabolického syndromu s geneticky fixovanou hypertirglyceridémií.
Metodika: Zvířatům byla podávána vysokosacharózová dieta po dobu 2 měsíců s CLA v koncentraci 2g/100g diety nebo se slunečnicovým olejem ve stejné koncentraci. Rezistence tkání k účinkům inzulinu byla monitorována in vitro při inkubaci tkáně bez inzulinu a s inzulinem podle inkorporace radioaktivně značené glukózy do glykogenu nebo lipidů. Koncentrace triglyceridů, NEMK, glukózy, v séru a obsah triglyceridů ve svalu byly stanoveny pomocí komerčně dostupných enzymatických testů. Hladiny inzulinu a adiponektinu byly stanoveny metodou ELISA.
Výsledky: Podávání CLA snížilo tělesnou hmotnost (382±8 vs 422±15 g, $p<0,05$) a hmotnost viscerální tukové tkáně (4,15±0,21 vs 3,55±0,25 g/100g t.v., $p<0,01$). CLA rovněž snížila sérové koncentrace triglyceridů (3,6±0,4 vs 5,01±0,49 g, $p<0,01$), neesterifikovaných mastných kyselin (0,86±0,05 vs 1,25±0,06 mmol/l $p<0,001$), glukózy (5,6±0,4 vs 7,0±0,4 mmol/l p<g/ml p0,05) a zvýšila hladiny adiponektinu (7,48±0,38 vs 6,10±0,33 <0,01). V tukové tkáni CLA zvýšila senzitivitu k účinku inzulinu. Zvýšená lipolýza mastných kyselin z tukové tkáně (2,15±0,18 vs 2,68±0,15 nmol/g/2hod, $p<0,05$) byla spojena s jejich zvýšenou oxidací v kosterním svalu (151±7 vs 124±5 nmol/g/2hod, $p<0,01$).
Závěr: Podávání CLA pozitivně ovlivnilo inzulínovou senzitivitu, parametry lipidového i sacharidového metabolizmu. Zvýšená oxidace mastných kyselin ve svalu může být spolu se zvýšenou sekrecí adiponektinu zapojena v mechanizmu antiadipogenních účinků CLA.
Studie byla podpořena grantem MZ 00023001.

P160
Assessment of whole-body energy expenditure in mice by system INCA:methodological aspects

Janovska P., Kus V., Jilkova Z., Matejckova E., Cerhakova J., Rossmeisl M., Kopecky J.
Department of Adipose Tissue Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic
janovska@biomed.cas.cz

Assessment of whole body energy expenditure and substrate partitioning using indirect calorimetry is auxiliary method for studying mice metabolism impacted of nutrition, different ambient temperature, genotype and intraperitoneal aplication of compound in adult but also during early postnatal development of mice. The main aim of this study was to test technical capability of the INCA system manufactured by Somedic (Sweden). This system allows to record continuous measurement of oxygen consumption, CO2 production and to calculate respiratory quotient (RQ) in individual animals. Data are recorded every 2 minutes. Several experiments with mice C57BL/6J (B/6J) fed high fat diet (cHF, 35% fat) or control diet (ST, 4.5% fat) have shown preferential utilization of fatty acids in animals exposed to cHF. Male 6-wk-old mice of A/J strains and B/6J were used for comparison of two different genotype measured in thermoneutral ambient temperature (30 °C) or exposed to the cold stress (15 °C). Measurements indicated induction of energy expenditure by cHF diet in A/J in 30 °C ambient temperature but not B/6J mice during post-weaning period. In both strains was assessed increased energy expenditure after exposition to cold stress. Male alpha2 AMPK KO mice and B/6J mice were used for studying of impact of intraperitoneal leptin aplication. In B/6J mice leptin decreased respiratory quotient, however there were no differences in alpha2 AMPK KO. For studying of the early postnatal development were used 10- to 12-day-old pups of B/6J mice. Measurement of single pups has shown the critical temperature of about 35 °C as the lower border of thermoneutral temperature zone. Measurement of the litters displayed the lower critical temperature (about 32 °C) in comparison with single pups.

P161
Identifikácia funkcie Sfh1 proteínu

Poloncová K., Griač P.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji
katarinapoloncova@hotmail.com

Sfh1 proteín je známy najmä ako najbližší homológ esenciálneho fosfatidylinozitol/ fosfatidylcholín transferového proteínu Sec14p. Napriek vysokej sekvenčnej homológii sa zdá, že Sfh1p nie je funkčne redundantný k Sec14, ale plní v bunke samostatnú funkciu. Tento predpoklad podporuje i odlišná lokalizácia Sec14p a Sfh1p v bunke a neschopnosť Sfh1p viazať fosfatidylinozitol(PI) aj fosfatidylcholín(PC). Zatiaľ čo Sec14 sa lokalizuje prevažne v cytosole a golgiho aparáte, Sfh1p sa nachádza v jadre. Funkcia Sfh1 proteínu zostáva do dnešného dňa neznáma. Bolo však zistené že pri niektorých stresových podmienkach ako zvýšený osmotický stres, zvýšená a znížená teplota, pôsobenie ťažkých kovov a v prítomnosti rapamycínu dochádza k zvýšenej expresii tohto proteínu.
Cieľom našej práce je objasnenie funkcie proteínu Sfh1 v bunke na čo sme zvolili niekoľko nezávislých prístupov.
Na základe dostupných informácií sme sa rozhodli otestovať fenotyp delečného mutanta sfh1 v stresových podmienkach a pri kombinácii niekoľkých stresových faktorov. Keďže u Sfh1p nebol zistený prenos PI ani PC pokúsili sme sa zistiť, či je schopný viazať iné lipidy, najmä tie s funkciou v signalizácii. Nakoniec sme sa pokúsili priblížiť k objasneniu funkcie tohto proteínu pomocou identifikácie mutácií synteticky letálnych s sfh1Δ pomocou syntetickej genetickej analýzy delečnej knižnice. Naše výsledky naznačujú že proteín Sfh1p sa podieľa na regulácii strtesových odpovedí, pravdepodobne prostredníctvom bunkovej signalizácie využívajúcej signálne lipidy.

P162

Auxiliary mechanisms are involved in the activation of the Gárdos effect in human red blood cells

Lakatoš B., Hudec R., Vaneková M., Varečka Ľ.
Department of Biochemistry and Microbiology, Slovak University of Technology, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
boris.lakatos@stuba.sk

Phorbol esters are activators of protein kinase C (PKC) and are known to exert multiple changes on partial reactions of cellular calcium homeostasis. Their effects on the basal Ca2+ influx is stimulatory but the agonist-induced Ca2+ influx and/or [Ca2+]cyt increase seems to be regularly inhibited by the pre-incubation with PMA in a number of non-excitable cells.
Here we show that phorbol-14-myristate-13-acetate (PMA) stimulated the 45Ca2+ influx into non-treated human red blood cells (RBC). In vanadate-treated RBC the 45Ca2+ influx and the Ca2+-dependent K+ efflux (the Gárdos effect – GE) were inhibited by comparable PMA concentrations. PMA, in addition, inhibited the hyperpolarisation accompanying the GE in vanadate-treated RBC and depolarised the membrane. The 45Ca2+ influx and GE induced by propranolol (PLL) were not inhibited by PMA. Incorporation of 32P in into RBC membrane proteins under conditions identical to those used for transport experiments was influenced by all vanadate, PMA and PLL. Vanadate specifically stimulated the phosphorylation of a band with m.w. 161 kDa. PMA phosphorylated several proteins (m.w. 72, 66 and 61 kDa), and dephosphorylated band 64 and 41 kDa. PLL caused a dephosphorylation of protein with m.w. 64 kDa and phosphorylation of protein with m.w. 66 kDa. The results are in accordance with a notion that the GE activation (induced by PLL or vanadate) is preceded by changes in the membrane protein phosphorylation and that the activation of the GE is regulated by an auxiliary mechanism different from the Ca2+ availability for the Ca2+-activated K+ channel. Furthermore, results show that the effects of vanadate and PLL resemble to the activation of agonist-stimulated signalling pathway in non-excitable cells.
Acknowledgement:
This work has been supported by the grants VEGA, nr. 2/3188/23 and 1/3251/06 and grant APVT 51-013802

Přednášky

O95

Renesance sacharidové biochemie v současném biomedicinském výzkumu: od intermediátů metabolismu po sacharidový informační kód a léčiva sladká uvnitř i na povrchu

Bezouška K.
Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta Praha a Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i. Praha
bezouska@biomed.cas.cz

Po počátečním zájmu biochemiků o výzkum sacharidů jako důležitých stavebních bloků živých buněk a klíčových látek intermediárního metabolismu v prvé polovině minulého století, byli jsme naopak v jeho druhé polovině svědky viditelného opadnutí tohoto zájmu, a přesunu sacharidů na periferii na úkor zdánlivě důležitějších molekul tvořících "lingua franca" živých systémů – nukleových kyselin a proteinů. Dnes však zažívá sacharidová biochemie ohromnou renesanci zejména díky technologickému pokroku v oblastech jako je syntéza sacharidů, strukturní analýza komplexních sacharidů a jejich směsí, a glykomika umožňující globální pohled na detaily biologických systémů založených na sacharidových interakcích. V centru pozornosti současného výzkumu zůstává objasnění povahy sacharidového informačního kódu jako třetího důležitého kódu odpovědného za regulaci biologických systémů, a to jak z hlediska jeho kódování pomocí enzymů syntetizujících složité oligosacharidové sekvence, tak i z hlediska jeho dekódování prostřednictvím sacharidových receptorů, zejména receptorů lektinového typu. Složité oligosacharidové sekvence nacházející se v jádru sacharidového informačního kódu pravděpodobně fungují na základě dvou aspektů své struktury. Evolučně starší je oblast tzv. jádra oligosacharidové sekvence shodné pro všechny eukaryotické organismy, a odpovědné za takové základní biologické funkce jako je zvýšení rozpustnosti proteinů, jejich správné poskládání, stabilizace proteinů, popř. ochrana před účinkem radikálů a oxidačního stresu. Naopak druhově specifické periferní sacharidové sekvence jsou kritické pro jemné doladění mnoha biologických procesů, zejména procesů mezibuněčné komunikace a imunitního rozpoznání. Konečným cílem poznání těchto procesů je vývoj účinných léčiv založených na adekvátně prezentovaných sacharidových strukturách, léčiv, která již nacházejí praktické uplatnění.
Podporováno granty od MŠMT (MSM_21620808 a 1M_4635608802), GAČR (204/06/0771), a GAAV (IAA5020403).

O96

Příklady využití průkazu galektinu-1, -2 a -3 a jejich glykoligandů v biologii buňky a diagnostice

Smetana K. Jr.
Karlova universita, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav
karel.smetana@lf1.cuni.cz

Galektiny představují rodinu minimálně 14 endogenních lektinů s charakteristickou strukturou karbohydráty rozpoznávající domény a vysokou reaktivitou k beta galaktosidům. Galektiny se podílejí na řadě nitrobuněčných dějů (proliferace, apoptóza, sestřich pre-mRNA), na mezibuněčných interakcích a interakcích buněk s mezibuněčnou hmotou. Pomocí protilátek proti galektinům a značených rekombinantních galektinů jsou demonstrovány příklady využití průkazu galektinů a jejich glykoligandů v buněčné biologii a případně diagnostice. Galektin-1 je vysoce exprimován v mezibuněčné hmotě stromatu basaliomů a spinocelulárních karcinomů. Je známo, že jeho exprese (a podobně i exprese galektinu-3) v buněčném jádře má vztah k proliferaci a sestřihu pre-mRNA. Vysoká reaktivita buněčných jader pro exogenní galektin-1 je jedním ze znaků tkáňových kmenových buněk. Galektin-2 je přítomen v PML jaderných tělíscích u řady typů buněk a jeho přítomnost je stimulována stresem, jemuž je buňka vystavena. Galektin-3 se v dlaždicových epitelech vyskytuje v cytoplasmě diferencovaných neproliferujících buněk. U spinocelulárních karcinomů jsou exogenním galektinem-3 rozeznávány vysoce diferencované nádorové buňky, jejichž přítomnost je nezávislým prognostickým znakem tohoto onemocnění. Na závěr lze konstatovat, že kombinace průkazu galektinů spolu s jejich glykoligandy představuje zajímavý nástroj s diagnostickým potenciálem.
Podpořeno z projektů MSM0021620806 and 1M0021620803

O97

Glykobiochemie klíšťat – přenašečů závažných onemocnění: sacharidy vázající proteiny a glykany

Grubhoffer L., Hajdušek O., Vancová M., Stěrba J., Rudenko N.
Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích;
Paraztiologický ústav Biologického centra Akademie věd České republiky, Branišovská 31, České Budějovice
liborex@paru.cas.cz

Sacharidy vázající proteiny klíštěte Ixodes ricinus: Ixoderin A (IxoA) a enzym chitinasa 1 (Chix1). Lektin Ixoderin A (IxoA) a enzym chitinasa 1 (Chix1) jsou potenciálními faktory přirozené imunity u klíšťat I. ricinus zejména proti bakteriálních a houbovým infekcím. Sekvenční analýzou fágové cDNA knihovny byly získány úplné sekvence genů pro oba proteiny IxoA a Chix1, dále pomocí RT-PCR zmapována exprese genů v jednotlivých vývojových stádiích klíštětě/ve vybraných tkáních dospělců. V molekule IxoA je přítomna jedna fibrinogenová doména (FreD). Analýzou genu pro Chix1 bylo potvrzeno, že molekula Chix1 obsahuje jednu doménu Glyco-18. charakteristickou pro chitinasy, postrádá však signální sekvenci a chitin-vázající doménu. Geny kódující IxoA a Chix1 byly úspěšně vypnuty metodou RNAi, v případě IxoA byla zcela vyblokovaná původní hemaglutinační aktivita v hemolymfě a důsledky vypnutí obou genů sledovány z funkčního hlediska.
Glykoproteiny a kyselina sialová ve slinných žlázách (SG) klíštěte Ixodes ricinus: Slinné žlázy jsou tkáňovým systémem klíštěte zásadního významu mimo jiné pro přenos patogenů na hostitele. Zmapovány byly glykoproteidy klíšťat v SG coby potenciální receptory pro přenášené patogeny, identifikována byla přítomnost kyseliny sialové (SGE), jakož i proteinu vázajícího tento sacharid (izolace afinitní chromatografií na koloně s navázaným lektinem Maackia amurensis II). Molekulové charakteristiky tohoto proteinu jej řadí mezi proteiny podobné myšímu sialoadhesinu z lektinové rodiny ęSiglecsę. Původ proteinu podobného myšímu Siglec-1 a jeho funkce v SG klíštěte jsou předmětem diskuse.

O98

Syntéza mykobakteriálnej dekaprenylfosfoarabinózy – nový cieľ pre pôsobenie účinných antituberculotik

Mikušová K., Makarov V., Moellmann U., Riccardi G., Cole S.T.
Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, Bratislava, SR; Bakh Institute of Biochemistry, Moscow, Russian Federation; Hans Knoell Institute, Molecular and Applied Microbiology, Jena, Germany; University of Pavia, Department of Genetics and Microbiology, Pavia, Italy; École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Global Health Institute, Lausanne, Switzerland
mikusova@fns.uniba.sk

Pôvodca tuberkulózy – Mycobacterium tuberculosis spôsobuje ochorenie, ktoré ohrozuje ľudstvo celé tisícročia a je jednou z najčastejších príčin mortality v dôsledku infekčného agens aj v súčasnosti. Dôležitou prioritou mykobakteriálneho výskumu je preto vývoj nových antituberkulotík. Sľubnými kandidátmi pre vývoj nových liečiv proti tuberkulóze sú vybrané deriváty zo skupiny benzotiazonínov (BTZ), ktoré vykazujú mimoriadne silné baktericídne účinky voči patogénnym mykobaktériám v niekoľkých in vitro a in vivo modeloch. Séria genetických experimentov naznačila, že jeden z génov, ktoré podliehajú špecifickým mutáciám pri vzniku rezistencie na BTZ je Rv3790. Naším cieľom bolo zistiť úlohu proteínu kódovaného týmto génom v mechanizme pôsobenia benzotiazonínov. Hoci presná enzýmová aktivita proteínu Rv3790 doposiaľ nebola popísaná, je známe, že spoločne s proteínom Rv3791 katalyzujú premenu dekaprenylfosforibózy (DPR) na dekaprenylfosfoarabinózu (DPA) dvojkrokovou reakciou zahŕňajúcou oxidáciu ribózy v polohe C2 a následnú redukciu keto-intermediátu na arabinózu. Táto reakcia je esenciálna pre fyziológiu mykobaktérií, pretože poskytuje jedinečný donor arabinózy pre syntézu dôležitých heteropolysacharidov mykobakteriálnej bunkovej steny – arabinogalaktánu a lipoarabinomanánu. Zistili sme, že proteín Rv3790 je priamym molekulárnym cieľom pre pôsobenie vybraných BTZ, a to na základe testovania aktivity proteínov Rv3790 a Rv3791 v membránach pripravených z buniek Mycobacterium smegmatis. Vybrané BTZ výrazne inhibovali oxidačný krok pri premene DPR na DPA v membránach buniek štandardného typu, zatiaľ čo v rezistentných kmeňoch M. smegmatis s mutáciou v géne homologickom s Rv3790 k takejto inhibícii nedochádzalo. Odhalenie molekulárneho cieľa pre pôsobenie skupiny benzotiazonínov s mimoriadne účinnou antimykobakteriálnou aktivitou je významným príspevkom pre ďalší vývoj týchto látok do štádia klinických štúdií.

O99

Optimizing of mycobacterial glycosyltransferases expression in Escherichia coli – the way for problematic proteins

Kostlánová N., Mikušová K., Wimmerová M.
National Centre for Biomolecular Research, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic;
Department of Biochemistry, Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Bratislava, Slovakia, SK-842 15;
Department of Biochemistry, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic
nikol@chemi.muni.cz

Expression of cloned genes in Escherichia coli is widely used both in research, for production of proteins for structural and and/or functional studies, and in industry for production pharmaceutically or biotechnologically interesting proteins. The production of protein in E. coli system is easy for handling; bacteria grow rapidly, in high density on inexpensive substrates. However some proteins cannot be overproduced in this system for variety of reasons. Proteins cannot be expressed at all, or they may fold incorrectly leading to the proteolysis or inclusion body formation.
This contribution shows on examples of mycobacterial glycosyltransferases (GT), which are difficult proteins (hydrophobic, fragile, often membrane or membrane associated), the wide range of optimizations on E. coli expression systems used for preparation of selected GTs in sufficient amount and purity. The different methods cover up comparison of several phusion recombinant protein expressions, variations of expression systems and conditions, the influence of renaturation processes, testing of cold-adaptive technology and chaperonins, etc.
The most extensive optimization has been done on galactosyltransferase Rv3782 [1] from Mycobacterium tuberculosis resulting in preparation of several Rv3782/phusion protein samples in enough amount and purity allowing preliminary crystallization trials and activity assays.

[1] Mikušová, K., Beláňová, M., Korduláková, J., Honda, K., McNeil, M.R., Mahapatra, S., Crick, D.C., Brennan, P.J.: J Bacteriol.188(18):6592-8 (2006)

O100

Proteomický a glykoproteomický výzkum plísňové a–N–acetylgalaktosaminidasy, zajímavého enzymu z Aspergillus niger s a–galaktosidasovou aktivitou

Mrázek H., Pompach P., Manglová D., Weignerová L., Křen V., Bezouška K.
Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Microbiology, Vídeňská 1083, CZ 142 20, Prague 4
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, CZ 12840 Prague 2
hynek.mrazek@biomed.cas.cz

-N-acetylgalaktosaminidasa (α-GalNAcasa; EC 3.2.1.49) -N-acetylgalaktosaminidasa byla purifikována z Aspergillus niger K2 CCIM pomocí několika po sobě následujících chromatografických metod. Bylo stanoveno pH optimum nativní a deglykosylované formyneboli α-N-acetylgalaktosaminid-N-acetylgalaktosaminohydrolasa je enzym selektivně štěpící terminálně vázaný GalNAc, který je přpojen O- α-D-glykosidovou vazbou an aminokyseliny Ser nebo Thr, či na oligosacharidový řetězec. α-GalNAcasy. Nativní enzym vykazoval pH optimum kolem hodnoty 1,8 a zachovával si aktivitu v rozmezí pH 1,0 – 3,5.U deglykosylovaného enzymu bylo stanoveno pH optimum kolem hodnoty 1,0. Teplotní optimum nativní i deglykosylované formy α-GalNAcasy bylo stanoveno na 45°C. Deglykosylovaná forma enzymu ztrácela svoji aktivitu se vzrůstající teplotou. Nativní forma si při teplotě 70°C zachovala 67% aktivitu. Hodnota izoelektrického bodu byla stanovena 4,8 na základě chromatofokusace. Byla potvrzena duální 10% α-galaktosidasiová aktivita. Alfa-N-acetylgalaktosaminidasa byla částečně sekvenována Edmanovou degradací a MALDI-MS. Genové fragmenty kódující α-N-acetylgalaktosaminidasu byly amplifikovány použitím cDNA izolovanou z Aspergillus niger K2 CCIM. Klonovaná DNA obsahovala 1450 páru bazí, aminokyselinová sekvence byla vypočítána na 480 aminokyselinových residuí s molekulovou hmotností 54,8 kDa, tato hodnota je totožná s hodnotou purifikovaného enzymu (vypočítána SDS-PAGE). Porovnáním aminokyselinové sekvence s GenBank byla zjištěna 96% homologie s α-galaktosidasou z Aspergillus niger. Analýzou identifikovaných sekvencí bylo zjištěno, že α-N-acetylgalaktosaminidasa je složena ze tří domén. DNA kódující α-N-acetylgalaktosaminidasu byla klonována do expresního vektoru pET 30+ a všechny tři domény byly individuálně exprimovány v Escherichia coli následnou indukcí IPTG.
This work was supported by. The Ministry of Education of Czech Republic (MSM_21620808), by the Institutional Research Concept for the Institute of Microbiology (AVOZ5020051), and by grants from the Czech Science Foundations (203/05/0172, 204/06/0771, IAA5020403).

O101
Surface plasmon resonance as an efficient tool in lectin research

Malinovská L., Brůnová L., Dejmková E., Wimmerová M.
National Centre for Biomolecular Research, Masaryk University; Department of Biochemistry, Masaryk University; Department of Biochemistry, Masaryk University; National Centre for Biomolecular Research and Department of Biochemistry, Masaryk University
malinovska@mail.muni.cz

Lectins are carbohydrate-binding proteins of nonimmune origin. They occur in all organisms (viruses, bacteria, plants as well as in animals) and execute various functions. Microbial lectins can recognize and bind to sugar moieties in glycoproteins or glycolipides on host cells surfaces. Thus, lectins can mediate adhesion to host cells. Adhesion is considered to be an important step in infection development as it protects pathogen from being swept away by natural cleansing mechanisms of the host. Consequently, lectins could be significant virulence factors and characterization of lectin-sugar interaction worths studying.
Biosensors with surface plasmon resonance detection (SPR) are powerfull tools for characterization of biomolecular interaction in general. The greatest advantages are real time monitoring (compared for example to enzyme linked lectin assay), low working concentrations of proteins (ug/ml) and small sample volume required for experiment (microliters).
We will demonstrate few examples how SPR could be used in lectin research, including determination of lectins binding specificity (direct binding or inhibition assay) or simple resolution whether lectin is active or not. This knowledge is necessary for example for optimization of expression and, using SPR, could be aquired quickly and with minimal sample consumption.
This work has been supported by Ministry of Education (MSM0021622413 and FRVS1200/2008/G3).

Poster

P163
Carbohydrate chemistry of congress wort, hopped wort and green beer

Cabálková J., Čmelík R., Bobáľová J.
Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v.v.i., Department of Proteomics and Glycomics, Veveří 97, CZ-60200 Brno, Czech Republic
cabalkova@iach.cz

Carbohydrates are non-volatile compounds that make up 92% of the solids in the wort solutions. According to the number of glucose units they are differentiated on maltose and maltotriose (known as fermentable saccharides), up to several tens of glucose units joined together with @-(1-4) less with @-(1-6) linkages (known as non-fermentable saccharides or dextrins).
The aim of the study is to monitor changes of carbohydrate composition in the wort samples of different varieties during the brewing process because they are of great fundamental and practical significance for the beer quality. Considering the sample complexity, the developed procedure involves application of several pretreatment procedures (precipitation, dialysis, etc.) followed by separation on HPLC on Prevail Carbohydrate ES (Alltech) analytical column with refractive index (RI) detection.
Noticeable changes in the quality as well as in quantity of carbohydrates from mono- up to tetradecasacharides in the congress wort, hopped wort, and green beer were observed. The most abundant carbohydrate maltose showed significant changes in the quantity, while most of non-fermentable carbohydrates did not reveal any significant changes.
Acknowledgement: Work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic, project No. 2B06037 and Institutional Research Plan AV0Z40310501.

P164
Bioinformatické vyhledávání lektinů z hub a plísní

Komárek J., Malinovská L., Wimmerová M.
Ústav biochemie, Masarykova univerzita; Národní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova univerzita;
Ústav biochemie a Národní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova univerzita
175127@mail.muni.cz

Lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny neimunitního původu schopné rozpoznávat a reverzibilně vázat různé sacharidové struktury. Ve srovnání s lektiny z jiných organismů, toho o houbových lektinech není mnoho známo a i jejich funkce zůstávají ve většině případů nejasné. Předpokládá se, že se mimo jiné účastní mezibuněčných interakcí. Pravděpodobně jsou zodpovědné za specifické rozpoznání kořenů určitého stromu při utváření symbiózy mezi stromem a houbou (mykorrhiza), nebo za specifickou adhezi patogenní houby k hostitelské buňce.
Tato práce se zabývá bioinformatickým vyhledáváním a analýzou lektinů z plísní a hub. Na základě sekvenční homologie byly pomocí lokálního přiřazení identifikovány houbové proteiny podobné známým lektinům. Pro takto nalezené potenciální lektiny a proteiny s lektinovou doménou byla predikována 3D struktura. Většina proteinů vykazovala strukturní podobnost s lektiny zařazenými do některé z rodin houbových lektinů (Aleuria aurantia, Coprinus cinereus, Pleurotus cornucopiae, Flammulina velutipes a „ricinové“ rodiny), a je pravděpodobné, že se jedná o nové členy těchto rodin. Dále byly nalezeny houbové proteiny podobné hemolytickým lektinům z Laetiporus sulphureus, lektinům z Psathyrella velutina a Sclerotinia sclerotiorum a rostlinným mannosa-specifickým lektinům.
Práce je podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM0021622413).

P165
Beta-N-Acetylhexosaminidasa z Aspergillus oryzae: produkce, purifikace a použití pro selektivní glykosylaci imunoaktivních látek

Drozdová A., Weignerová L., Křenek K., Křen V.
Centrum biokatalýzy a biotransformací, Mikrobiologický ústav v.v.i., Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha,
drozde@centrum.cz

Extracelulární beta-N-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) z vláknité houby Aspergillus oryzae CCF 1066 byla isolována pomocí hydrofobní chromatografie (Phenyl Sepharosa), chromatografie na katexu (S-Sepharosa) a gelové chromatografie (Superdex 200). Byla provedena optimalizace kultivačních podmínek pro produkci enzymu (složení média, pH, objem média a vliv koncentrace induktoru).
NK (natural killers, přirození zabíječi) jsou důležitou součástí vrozené protinádorové imunitní odpovědi. NK buňky exprimují celou řadu povrchových receptorů, které aktivují nebo inhibují jejich zabíječskou funkci (1). Beta-N-Acetylhexosaminidasa byla použita pro selektivní glykosylaci látek potenciálně využitelných pro aktivaci receptorů CD69 lidských nebo NKR-P1 krysích NK buněk. p-Nitrofenyl-beta-N-acetylglukopyranosid (pNP-beta-GlcNAc) a/nebo p-nitrofenyl-beta-N-acetylgalaktopyranosid (pNP-beta-GalNAc) byl použit jako donor, (GlcNAc-NH-S-NH)2C10H20 jako akceptor. Produkty reakce byly isolovány a spektrálně charakterizovány. Tyto látky by měly sloužit k měření geometrie nativních NK receptorů.

1) Raulet, D.H. Nature Immunology 2004, 5, 996-1002.

Tato práce vznikla za podpory grantů COST Chemistry D34 (MŠMT OC 136), MŠMT grant LC06010, GA AV ČR grant IAA400200503 a výzkumného záměru MBÚ AV ČR AV0Z50200510.

P166
Comparison of three Aspergillus nidulans beta-mannanases

Kolenová K., de Vries R. P., Stalbrand H.
Chemický ústav SAV Bratislava; Microbiology, Department of Biology, Utrecht University, The Netherlands; Department of Biochemistry, Lund University, Sweden
Katarina.Kolenova@savba.sk

Aspergillus nidulans endo-beta-1,4-mannanases AnMan5A (AN3358.2), AnMan5B (AN3297.2), AnMan5C (AN6427.2) of glycoside hydrolase family 5 were expressed in Pichia pastoris, affinity purified using His-tag and characterized. The protein sequence identities between these three enzymes are pairwise 32 – 39 %. Judged from the sequences the three A. nidulans mannanases appear to consist of sole catalytic modules and do not carry carbohydrate binding modules. The pH and temperature optima for AnMan5A were previously reported to be 5,5 and 52°C, respectively. We determined the corresponding values for the two other mannanases to be 6.0 and 60°C (AnMan5B) and 5.0 and 55°C (AnMan5C). Thus, in terms of temperature and pH preference, there are no dramatic differences between these three enzymes. However, the specific activity on locust bean gum varied. It was 2220, 370 and 5060 nkat/mg protein for AnMan5A, AnMan5B and AnMan5C, respectively. All three mannanases were also active on guar gum, konjac glucomannan, ivory nut mannanan and manno-oligosaccharides. The end products of ivory nut mannan and mannooligosaccharides (M3-M6) hydrolysis were mannobiose and mannotriose for AnMan5A, mannobiose for AnMan5B and mannose and mannobiose for AnMan5C. The end products reported for Aspergillus niger and Trichoderma reesei mannanases are mannobiose and mannotriose. It seems that AnMan5A is similar to these enzymes while AnMan5B and AnMan5C seem not to accumulate mannotriose but rather cleave it rapidly. The results indicate differences in substrate binding within the active sites of the three enzymes. Similar to several mannanases all three A. nidulans GH5 mannanases were able to transglycosylate.

P167
The presence of N-acetylneuraminic acid modified protein in salivary glands of ticks Ixodes ricinus

Vancová M., Bučinská L., Štěrba J., Grubhoffer L.
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích; Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR v.v.i., České Budějovice
vancova@paru.cas.cz

Saliva of medically important parasites, ticks Ixodes ricinus, contains pharmacologically active molecules, as well as molecules that facilitate transmission of several pathogens. Formerly, we described by lectin labeling experiments and enzymatic treatment site specific glycosylation of salivary glands (SGs) isolated from unfed and partially fed tick females. We assumed the presence of proteins modified with N-acetylneuraminic acid (NeuAc) by positive labeling using NeuAc-specific lectins Maackia amurensis (MAA II) and Sambucus nigra. The total sialic acid level in SG homogenates was colorimetrically quantified by the periodic acid-thiobarbituric acid test. We used MAA II affinity chromatography and purified a protein about 100 kDa from SGs isolated from partially fed females. Unfortunately, the protein used to be isolated only in nanogram amounts. Data obtained by Edman degradation showed the similarity of its N-terminal sequence with mouse sialoadhesin that belongs among sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins (siglecs). The isolated protein seems to be tightly bound with a sialylated ligand or to be directly modified with NeuAc and thus detected with the lectin MAA II. We used polyclonal antibody raised against Siglec-1 and found the Siglec in fluid transporting epithelium of SGs isolated from partially fed ticks. The presence of host immunoglobulins bound to tick carrier protein in the saliva of ticks was described also earlier. During tick feeding, the tick's SGs function also in removal of these harmful molecules back to the hosts. We supposed that the isolated tick's NeuAc modified protein is of host origin and is probably transported back to the host trough the epithelium of SGs. The presence of the host Siglec directly in the saliva od ticks and its functions will be further tested. Sialic acid was suggested in invertebrates only during early development of insects Drosophila melanogaster and in cicada Philaenus spumaris.

P168
Štúdium úlohy predpokladanej glykozyltransferázy MSMEG_2699 v procese biosyntézy bunkového obalu mykobaktérií

Beláňová M., Jackson M., Korduláková J., Mikušová K.
Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika; Mycobacterial Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA
belanova@fns.uniba.sk

Jedinečný, extrémne hrubý a vysoko nepriepustný bunkový obal mykobaktérií predstavuje účinnú bariéru, ktorá chráni baktériu pred účinkom liečiv a napomáha tak k prirodzenej rezistencii voči mnohým druhom konvenčných antibiotík. Nakoľko je mykobakteriálna bunková stena tvorená niektorými unikátnymi štruktúrami, ktoré sa v ľudskom organizme nenachádzajú, inhibícia metabolických dráh podieľajúcich sa na ich výstavbe by mala byť pre patogén špecifická. Štúdium biosyntézy zložiek bunkového obalu mykobaktérií má tak kľúčový význam pre identifikáciu vhodných cieľov pre vývoj nových liečiv proti tuberkulóze.
Bunkový povrch mykobaktérií je charakteristický vysokým podielom polysacharidových molekúl a rôznych unikátnych glykokonjugátov. Glykozyltransferázy zodpovedné za ich syntézu tak predstavujú najväčšiu triedu enzýmov podieľajúcich sa na výstavbe bunkového obalu. V genóme Mycobacterium tuberculosis bol identifikovaný definovaný obmedzený počet pravdepodobných glykozyltransferáz, z ktorých iba jedna tretina bola do súčasnej doby funkčne charakterizovaná.
Na základe in silico analýz gén MSMEG_2699 z nepatogénneho kmeňa Mycobacterium smegmatis mc2155 (homológ génu Rv2719c z M. tuberculosis H37Rv) kóduje enzým s glykozyltransferázovou aktivitou. Je zaradený do GT-1 sekvenčnej triedy glykozyltransferáz, ktorá je charakteristická invertujúcim mechanizmom katalýzy a substátovou špecifitou pre glykozylnukleotidy ako donorové molekuly. Využitím molekulárno-biologických metód sme pripravili mutantný kmeň M. smegmatis s disrupovaným génom MSMEG_2699. Študovaný gén sme cielene inaktivovali pomocou alelovej výmeny s génom prerušeným kanamycínovou kazetou. Fenotypický prejav inaktivácie génu bude študovaný pomocou metabolického značenia kultúr 14C-glukózou.
Táto práca bola podporená Grantom Univerzity Komenského č. UK/338/2008.

P169
Chemo-enzymatic synthesis of bioactive furanosyl-containing glycoconjugates

Chlubnová I., Nugier-Chauvin C., Daniellou R., Králová B., Ferrieres V.
Institute of Chemical Technology Prague, Department of Biochemistry and Microbiology, Technická 5, 16628 Praha 6; Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, UMR CNRS 6226 Syntheses organique et Systemes Organisés, Avenue du Général Leclerc, 35700 Rennes, France
Ilona.Chlubnova@vscht.cz

Glycoconjugates are thanks to their high structural diversity key molecules involved in many biological processes such as cellular communication or molecular recognition. Reductive monosaccharides can cyclise in a furanose or pyranose form. While mammalian cells are exclusively built up with pyranosides, some microorganisms including those highly pathogenic are able to synthesize furanose-containing conjugates. Within such biomolecules D-galactose is probably the most widespread hexose. Since furanose-containing conjugates are neither synthesized nor metabolized by mammals, they are highly interesting targets as new pharmacologically effective substances which can be involved as haptens in glycosidic vaccines.
Our project relies in synthesis of bioactive furanosyl-containing haptens. Unusual diglycosides composed of D-hexofuranosyl entities were prepared by a chemoenzymatic route using transglycosylation reactions assisted by the thermostable α-L-arabinofuranosidase produced by Clostridium thermocellum, Araf51. We demonstrate that this enzyme is an efficient tool for catalyzing transglycosylation in the presence of various alcohols as well as p-nitrophenyl glycosides. The required monosacharidic substrates were first prepared according to multistep organic syntheses.
This project is supported by MŠMT: MSM 6046137305.

P170
Purification of two Phanerochaete chrysosporium glucuronoyl esterase

Ďuranová M., de Vries R. P., Biely P.
Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; Microbiology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands
chemmkru@savba.sk

Glucuronoyl esterase hydrolyses alkyl and arylalkyl esters of D-glucuronic and 4-O-methyl-D-glucuronic acid and has been postulated to hydrolyze ester linkages between 4-O-methyl-D-glucuronic acid residues of glucuronoxylans and aromatic alcohol of lignin. Enzymes with the ability to cleave these types of linkages could have a significant biotechnological importance.
The filamentous basidiomycete Phanerochaete chrysosporium produces glucuronoyl esterase during growth on sugar beet pulp. Two putative genes encoding this enzyme, ge1 and ge2, were isolated and cloned. Heterologous expression in Schizophyllum commune resulted in extracellular glucuronoyl esterase activity, demonstrating that these genes encode this enzymatic function. Both glucuronoyl esterases were partially purified. Interestingly, the first purification step showed the differences in GE1 and GE2 affinities to ion exchange chromatography. GE1 binds to CM Sepharose – cation exchange chromatography medium whereas GE2 to DEAE Sepharose – anion exchange chromatography medium. During the second purification step – hydrophobic chromatography – GE1 and GE2, respectively, were adsorbed to Phenyl Sepharose and then were eluted by 0.2 M ammonium sulphate.
We take use of a different binding of GE1 and GE2 to ion exchange chromatography medium also during purification of glucuronoyl esterases from P. chrysosporium sugar beet pulp-medium.
This work was supported by the grant APVV No. 51-003805.

P171
Produkce a purifikace alfa-N-acetylgalaktosaminidasy a její použití pro glykosylace aminokyselin

Michálková K., Weignerová L., Křen V.
Centrum biokatalýzy a biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha
klara.michalkova@vscht.cz

K produkci enzymu alfa-N-acetylgalaktosaminidasy byl použit kmen kultury Aspergillus niger CCIM K2. Extracelulární produkce enzymu byla indukována přídavkem sojové odtučněné mouky. Enzym byl z média izolován pomocí ionexové chromatografie (katex, Fractogel EMD SO3-), gelové chromatografie (Superdex 200) a chromatofokusace (Mono P 5/200).
Alfa-N-acetylgalaktosamin vázaný O glykosidickou vazbou na serin nebo threonin tvoří látku známou jako Tn antigen (epitop).
Purifikovaná alfa-N-acetylgalaktosaminidasa byla použita ke glykosylaci aminokyselin serinu a threoninu, dále aminokyselin s chráněnou aminoskupinou N-(tert-butoxykarbonyl)-L-serinu a N-(tert-butoxykarbonyl)-L-threoninu. Glykosylační reakce volného serinu a threoninu se nezdařila, nebyly nalezeny žádné produkty této glykosylační reakce. Glykosylace chráněných aminokyselin byly úspěšné. Produkty reakce byly isolovány a spektrálně charakterizovány.
Tato práce vznikla za podpory grantů COST Chemistry D34 (MŠMT OC 136), MŠMT grant LC06010, GA AV ČR grant IAA400200503 a výzkumného záměru MBÚ AV ČR AV0Z50200510.

Ref.: L.Weignerová, T.Fillipi, D.Manglová and V.Křen: Induction, purification and characterization of alfa-N-acetylgalctosaminidase from Asperfillus niger. Applied Microbiology and Biotechnology. 2008, in print.

P172
Preparation of the tools for investigation of the putative mycobacterial ABC transporter MSMEG_6366 – MSMEG_6369

Dianišková P., Korduláková J., Kaur D., Jackson M., Brennan P. J., Mikušová K.
Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia; Mycobacterial Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA
dianiskova@fns.uniba.sk

The mycobacterial cell wall, which is composed of covalently linked peptidoglycan, heteropolymeric arabinogalactan and highly hydrophobic mycolic acids, represents an efficient barrier against stress factors that pathogenic members of Mycobacterium spp. face during the course of infection. During the recent years a lot of effort has been expended on the deciphering of the biochemical pathways for the biosynthesis of this complex structure, which provides an attractive target for the development of the drugs against tuberculosis. Within the biogenesis of arabinogalactan (AG) several crucial glycosyltransferases have been discovered. Nevertheless, the questions of topology of the events leading to the production of full-length AG in the pseudo-outer layer of mycobacteria remain open. Recently, we have described the function of the galactofuranosyl transferase GlfT1 encoded by MSMEG_6367 of Mycobacterium smegmatis mc2 155. glfT1 gene is located in a highly conserved cluster involved in arabinogalactan biosynthesis and together with other two genes, MSMEG_6366 and MSMEG_6369, forms operon-like structure. MSMEG_6366 gene encodes the nucleotide binding protein and MSMEG_6369 gene encodes the membrane-spanning protein of a putative ABC transporter. Here we present preparation of the tools for the investigation of this putative ABC transporter, including the strains of Mycobacterium smegmatis and E. coli expressing recombinant proteins MSMEG-6366 and MSMEG_6369 in the soluble form and a knock-out strain with the disrupted MSMEG_6369 gene. We also demonstrate that MSMEG_6366 and glfT1 (MSMEG_6367) genes can not be knocked out in M. smegmatis suggesting their essentiality for the growth of M. smegmatis.
This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. RPEU-0012-06, and by European Comission under contract LSHP-CT-2005-018923"NM4TB“ (KM), grants NIH, NIAID AIDS-FIRCA TW 006487 (PJB and KM) and NIH, NIAID AI-18357 (PJB).

P173
Aspergillus fumigatus lectins

Houser J., Daňková V., Wimmerová M.
National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University; Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University; National Centre for Biomolecular Research and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University
houser@mail.muni.cz

Aspergillus fumigatus is a saprophytic fungus that can be found naturally in environment. It can become a human pathogen, once its conidia are inspired. Immunocompetent human is rarely affected, because of sufficient immune mechanism. Therefore A. fumigatus was signed as weak pathogen responsible mainly for allergic-like diseases, such as farmer's lung. The research over past 20 years revealed that it is responsible for hard infections in immunodeficient patients. So called invasive aspergillosis makes complications at cancer and leukaemia patients – it is now a major cause of death at leukaemia treatment centre, bone marrow and solid-organ transplantation units [1].
Lectins present at A. fumigatus surface are of great importance for successful fixation of conidia on human epithelia. Understanding of their interactions with sugar moieties should help us understand A. fumigatus abilities and may play the key role in treatment.
Based on sequenced genome there have been found at least 7 lectin-like proteins encoded so far. Some of them have been studied, but the others are still unknown in structural and binding properties. The aim of our study is bioinformatic search of A. fumigatus lectins followed by studying of recombinant lectins via molecular-biological and biochemical approaches. Results could provide information for new drug design.
This project has been supported by Ministry of Education (MSM0021622413) and Grant Agency (GA/303/06/0570) of the Czech Republic.

1) Latgé J.-P.: Clinical Microbiology Reviews 12 (2), 310–350 (1999)

P174
Nepřirozené substráty beta-N-acetylhexosaminidas: syntéza nových imunoaktivních glykosidů

Slámová K., Bojarová P., Křenek K., Gažák R., Bezouška K., Spencer J. W., Macková M., Křen V.
Centrum biokatalýzy a biotransformací, Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, CZ; Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, CZ; Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, CZ; Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, 30 Flemington Road, 3010 Parkville, Victoria, Australia
kristynaslamova@atlas.cz

Fungální beta-N-acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) jsou glykosidasy s širokou substrátovou specifitou a velkým syntetickým potenciálem. Byly použity k syntéze nových N-acetylgluko- a galaktosaminidů s vysokou imunologickou aktivitou. Tyto látky se váží na CD69 receptor lidských přirozených tzv. zabíječských (NK) buněk, čímž se spustí signální kaskáda vedoucí k aktivaci cytotoxických mechanismů. Naše nejnovější výsledky ukazují, že vazba aktivačních molekul na receptor je zesílena přítomností negativně nabité skupiny.
Byla připravena sada sedmi derivátů p-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy-b-D-glukopyranosidu. Připravené glykosidy byly testovány jako ligandy aktivačních receptorů CD69. Zatímco přítomnost nabité skupiny na C-6 (sulfát, karboxylát) přinesla značné zesílení vazby ligandu na receptor CD69 oproti nenabitému analogu, nabitá skupina na jiném uhlíku cukerného skeletu neumožňuje vazbu ligandu na receptor. Screening 24 fungálních beta-N-acetylhexosaminidas z knihovny glykosidas Laboratoře biotransformací ukázal značné rozdíly ve schopnosti těchto enzymů utilizovat různě modifikované glykosidy. V současné době je naším cílem připravit z těchto substrátů transglykosylací s beta-N-acetylhexosaminidasami nové vysoce imunoaktivní disacharidy.

Tato práce vznikla za podpory grantů IAA 400200503 a MŠMT LC06010.

P175
Alfa-L-Fukosidasová a beta-D-fukosidasová aktivita bakterie Paenibacillus thiaminolyticus

Benešová E., Lipovová P., Riedl J., Králová B.
ÚBM, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6, 166 28, ČR; ÚOCHB AV ČR, Flemingovo náměstí 2, Praha 6, 166 00, ČR
Eva.Benesova@vscht.cz

Glykosidasy jsou enzymy, které se v organismu účastní metabolismu oligo- a polysacharidů, glykoproteinů a glykolipidů. Součástí sacharidových řetězců molekul zahrnutých v důležitých biologických procesech, jakým je například i imunitní odpověď, bývá také L-fukosa. Z toho důvodu roste v současné době snaha o syntesu nových fukosylovaných molekul s potenciálním medicínským využitím. Při těchto syntesách bývá využívána schopnost některých enzymů katalyzovat transglykosylační reakce.
U souboru bakteriálních kmenů byla testována schopnost štěpit chromogenní substráty p-nitrofenyl-alfa-L-fukopyranosid a p-nitrofenyl-beta-D-fukopyranosid. Na základě získaných výsledků byl pro další práci vybrán Paenibacillus thiaminolyticus. Během purifikace alfa-L-fukosidasy byla zjištěna přítomnost dvou isoenzymů. U obou byla potvrzena schopnost katalyzovat transglykosylační reakce s nesacharidovým akceptorem ((S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin) s antivirální aktivitou. Vzhledem k tomu, že beta-D-fukosidasovou aktivitu často vykazují beta-D-galaktosidasy, byl gen tohoto enzymu s využitím chromogenního substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktosidu nalezen a sekvenován. Rekombinantní enzym byl produkován v buňkách E. coli BL21 Gold, přečištěn metaloafinitní chromatografií a po proměření základních charakteristik byl potvrzen předpoklad jeho dvojí aktivity.
Na dosažené výsledky bude navazovat podrobnější studie transglykosylačních schopností všech získaných enzymů.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT: MSM6046137305

Postery

P192 (Poster vyvěšen v sekci „Rostlinná biochemie a molekulární biologie“)
Cloning, expression and characterization of eukaryotic adenine deaminases

Pospíšilová H., Novák O., Šebela M., Frébort I.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University; Laboratory of Growth Regulators, Palacký University/Institute of Experimental Botany AS CR
h.pospisilova@upol.cz

According to older reports, some yeast and mammalian enzymes can cleave a cytokinin to hypoxanthine and an amine derived from the N6 side-chain. Of this class of enzymes, adenine deaminase (ADE, EC 3.5.4.2; producing hypoxanthine and ammonia from adenine) found in yeast and fungi shows high degree of protein sequence similarity with mammalian adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4).
Selected genes encoding yeast adenine deaminases SPBC1198.02 (Schizosaccharomyces pombe) and AAH1 (Saccharomyces cerevisiae) were cloned and expressed in Escherichia coli under IPTG-inducible promoter. Homogenous recombinant proteins were then obtained by affinity purification using His-tag.
For both yeast enzymes, significant activity towards adenine was found, but cytokinins were cleaved with lower efficiency. Degradation of drugs derived from cytokinins was not detected. A reference sample of human adenosine deaminase was also tested with these compounds. Whereas cytokinin-based drugs were degraded with the low rate, cleavage of aromatic cytokinins and isoprenoid cytokinins was not observed. The reaction products were identified by HPLC coupled to UV and Q-TOF detectors.

P193
Role restrikční podjednotky HsdR u restrikčních enzymů typu I

Urbánková T.
Česko – Anglické gymnázium
xurbankovat@seznam.cz

Typ I restrikčně modifikačních enzymů rozpoznává specifické DNA sekvence, ale štěpí v nespecifických místech v různých vzdálenostech od rozpoznávacího místa v reakci spojené s ATP-dependetní DNA translokací. Ačkoli mechanismus štěpení DNA restrikčními enzymy typu I je intenzivně studován, zůstává stále neobjasněn. Důvod, proč je mechanismus restrikčních enzymů typu I tak komplikovaný, dává podnět k dalším biochemickým experimentům a strukturním studiím.
V práci, která je prezentovaná zde, jsme purifikovali rekombinantní restrikční podjednotku HsdR endonukleasy EcoAI z E. coli v čistotě, která je dostačující pro biochemické experimenty. Dalším cílem této práce bylo optimalizovat poměr methyltransferasy a HsdR podjednotky, abychom získali aktivní enzymový komplex schopný linearizovat cirkulární DNA s jedním rozpoznávacím místem pro EcoAI, a byly optimalizovány reakční podmínky pro testování enzymové aktivity EcoAI endonukleasy.

P194

Izolace a klonování genu pro cystatin 1, inhibitor cysteinové proteázy klíštěte obecného Ixodes ricinus

Pech D.
Parazitologický ústav; Biologické centrum AV ČR
dawid.pech@gmail.com

Cílem práce bylo seznámit se s metodami a postupy pro studium nukleových kyselin, osvojit si je a využít pro svůj laboratorní projekt včetně zpracování a vyhodnocení získaných údajů.
Izolaci RNA byla provedena pomocí komerčně vyráběného činidla TRI REAGENT® z tkání klíštěte obecného Ixodes ricinus se záměrem detekovat a izolovat gen pro bílkovinu cystatin 1 s následným začleněním do plasmidu a určením sekvence genu pro tuto bílkovinu. Sekvence byla porovnána s již dříve získanými sekvencemi jiných autorů, uloženými v genové bance a přístupných na internetu. Identifikovaný gen byl následně zaklonován do expresního systému za účelem dalšího studia klíštěcího cystatinu 1.
Z 1 vzorku RNA získaného z 1 exempláře klíštěte obecného Ixodes ricinus byla pomocí RT-PCR syntetizována cDNA. Z takto získané cDNA byl pomocí PCR o 30 cyklech s primery CystatinForward a CystatinRevers amplifikován gen pro cystatin 1. Po separaci PCR produktu kapilární gelovou elektroforézou a reamplifikací pomocí PCR, byl PCR produkt obsahující sekvenci nukleotidů kódujících gen pro cystatin 1 začleněn (ligován) do vektoru pCR®4-TOPO pro sekvenační reakci.
Buňky bakterií E. coli byly podrobeny transformaci tímto vektorem. Po nárůstu bakteriálních kolonií E. coli a pomocí screeningu, bylo vybráno 10 kolonií k izolaci plasmidové DNA.
Bylo zpracováno 10 vzorků, z nichž 4 byly použity pro sekvenační reakci. Zjištěné sekvence byly porovnány mezi sebou. Takto získané pořadí nukleotidů bylo odeslána do genové banky na internetu. Výsledky porovnání jsou uvedeny ve 4. kapitole práce.
1 vzorek ze 4 s bezchybnou sekvencí byl ligován do expresního systému pET100/D-TOPO® s cílem získat rekombinantní formu cystatinu 1 k dalšímu studiu.
Práci jsem vypracoval jako student BiGy v rámci SOČ ve šk. r. 2007-2008 na pracovišti Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích (pod vedením prof. RNDr. Libora Grubhoffera, CSc. Natalie Rudenko, PhD. a Maryny Golovchenko, MSc.)

P195

Vitální analýza beněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

Pešák L.
Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno
lukas.pesak@seznam.cz

Průtoková cytometrie je metodologie často využívaná v klinické praxi i ve výzkumných laboratořích. Jednou z jejích aplikací je analýza buněčného cyklu založená na detekci množství DNA. S využitím histogramu buněčného cyklu můžeme analyzovat zastoupení fází buněčného cyklu, buněčnou ploidii a apoptózu. Získané výsledky slouží mj. při detekci nádorových buněk, které mají deregulovaný buněčný cyklus. Existuje celá řada fluorescenčních barviv schopných se kvantitativně vázat na DNA a ty emitují fluorescenci po excitaci zdrojem světla (např. laser). Kvalita DNA histogramu (koeficient variance – CV)závisí na mnoha faktorech. Většina značek je schopna připojit se k buněčné DNA pouze po permeabilizaci buněčné membrány. Existují ale i značky, které se akumulují v živých buňkách a obarví DNA (=vitální analýza). Tento způsob měření navíc umožňuje kombinovat DNA analýzu s analýzou dalších parametrů, např. fázově specifické molekuly (cdk, cykliny) a exprese cytoplazmatických proteinů. Takto získáme komplexnější přehled o stavu buněčných populací.
Tato práce přináší srovnání vitální analýzy buněčného cyklu pomocí značky Vybrant DyeCycle Orange (Invitrogen, CA, USA)s nevitální analýzou využívající propidium jodid. Jsou v ní popsány vhodné podmínky značení a také limity při použití značky od Invitrogenu. Analyzoval jsem buněčné cykly šesti různých druhů in vitro epiteliálních buněk na průtokovém cytometru a ve speciálním softwaru pro analýzu dat DNA histogramů. Pro zavedení metody značení pomocí Vybrantu jsem testoval dvě různé kondice pro inkubaci buněk se značkou – HBSS a RPMI doplněné 10% bovinního fetálního séra.
Pozoroval jsem odlišnosti od posteru týkajícího se Vybrant DyeCycle, jež naleznete na internetových stránkách: <http://probes.invitrogen.com/servlets/posters?id=611>.Vyplývá z něj, že tato značka je srovnatelná se značkou Hoechst 33342, jež se používá rovněž pro vitální analýzu, avšak je pro ni nutné pořídit speciální průtokový cytometr s drahým ultrafialovým laserem.

P196
Dynamika aktivity trávicích enzymů klíštěte Ixodes ricinus v průběhu sání

Konvičková J.
Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice; Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha; Jitka.Konvickova@seznam.cz

Klíště Ixodes ricinus je nebezpečný ektoparazit, který přenáší virus klíšťové encefalitidy a spirochety Lymské boreliózy. Přenos těchto patogenů je do značné míry závislý na době sání a zjevně souvisí s postupným trávením hostitelské krve. Proto jsem se ve své práci zaměřila na studium dynamiky trávení krve pomocí sledování aktivity dvou klíčových cysteinových peptidáz trávicího systému klíštěte: (i) cathepsinu B (IrCB), který je nejvýkonnější hemoglobinázou a (ii) asparaginylové endopeptidázy (IrAE), která funguje při aktivaci ostatních pro-enzymů trávicí kaskády. Aktivity těchto enzymů byly stanoveny pomocí specifických fluorescenčních substrátů v extraktech střevních tkání vypitvaných z dospělých samic. Porovnáním aktivity v průběhu sání jsem zjistila, že aktivita IrCB i IrAE je až do 3. dne minimální, na úrovni nenasátých samic. V další fázi sání od 3. do 7. dne se aktivita výrazně (až tisícinásobně) zvyšuje a na této úrovni pak zůstává až do úplného nasátí klíštěte. Tyto výsledky korelují s množstvím IrCB a IrAE ve střevních homogenátech zjištěných pomocí imunoblotingu a naznačují, že za výrazným zvýšením aktivity obou enzymů je jejich zvýšená proteosyntéza spíše než aktivace stávajících proenzymů. Srovnáním aktivit v homogenátech střevních tkání a střevního obsahu jsme potvrdili, že trávení krve probíhá u klíšťat intracelulárně. Aktivitní profil IrCB a IrAE byl určen i v celotělových homogenátech vývojových stádií klíštěte. Kromě sajících dospělých samic byly vysoké aktivity zjištěny u nasátých nymf. Zbytková aktivita byla stanovena i u dospělých (nesajících) samců a zřejmě pochází z předchozího nymfálního stádia. Moje výsledky mohou být použity při hledání vhodného kandidáta pro racionální vývoj tzv. „proti-klíštěcí“ vakcíny v naší laboratoři.

P197
Využití elektrochemické analýzy pro sledování modifikace nukleových kyselin platinovými cytostatiky

Těsnohlídková L.
Česko-anglické gymnázium
l.tesno@seznam.cz

Abstrakt
Cílem této práce bylo najít elektrochemickou metodu, pomocí které by bylo možné citlivě sledovat vazbu protinádorově účinných platinových komplexů na nukleové kyseliny. Tato metoda by pak mohla sloužit při výzkumu účinků nově vyvinutých platinových komplexů na DNA.
Nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní, což znamená, že jsou schopny odevzdávat či přijímat elektrony. Poskytují tedy elektrochemické (voltametrické) signály, pomocí nichž je lze zkoumat. Například je možné na základě změn některých voltmetrických signálů zjistit, zda došlo k modifikaci (poškození) DNA nějakou jinou látkou.
Vyzkoušeno bylo několik experimentálních přístupů a elektrochemických technik. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na základě modifikace směsi syntetických oligonukleotidů (ODN), jejichž modifikace je sledována, a plasmidové DNA, která slouží jako nespecifický kompetitor (cisplatina si za těchto podmínek „vybere“ pro ni výhodnější vazebné místo, omezí se tak tvorba nestabilních aduktů v ODN). Elektrochemické vlastnosti takto modifikovaných ODN byly sledovány pomocí cyklické voltametrie na rtuťové elektrodě v oblasti negativních potenciálů, kde docházelo v přítomnosti platiny ke katalytickému vyvíjení vodíku. Pro stanovení stupně modifikace byla měřena hodnota proudu na anodické větvi při potenciálu -1,3V.
Pomocí této metody bylo možno snadno sledovat i relativně nízké stupně modifikace specifických ODN cisplatinou.

P198
Vliv adipokinetického hormonu na příjem potravy u hmyzu

Krejčová S.
Gymnázium Česká 64, České Budějovice
sylva.krejcova@seznam.cz

Adipokinetické hormony (AKH) jsou hmyzí peptidické hormony, jejichž hlavním cílem je mobilizace energetických zásob ve stresových situacích jako je intenzívní pohyb, zranění, infekce nebo otrava jedem. Kromě této hlavní funkce hrají roli v řadě doprovodných procesů, které podporují mobilizaci energie, které však na druhé straně tlumí momentálně nevýznamné procesy nebo procesy potencionálně spotřebovávající energii (anabolické procesy) uvolněnou na řešení stressu. AKH jsou vylučovány endokrinním orgánem corpora cardiaca, který se nachází v blízkosti mozku. Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že AKH ovlivňuje příjem potravy u ploštice ruměnice pospolné Pyrrhocopis apterus. Měření spotřeby potravy (lipová semínka) probíhalo po aplikaci AKH jejím přesným vážením na analytických vahách. K pokusům byl použit vlastní adipokinetický hormon těchto ploštic – Pyrap-AKH aplikovaný ve třech variantách: (1) jednorázová injekce (10 pmol AKH), (2) jednorázová topikální aplikace pod křídla (80 pmol AKH) a (3) opakovaná topikální aplikace (80 pmol AKH v čase 0, 1 a 2 dny). Spotřeba potravy byla měřena následující 3 dny po (první) aplikaci hormonu. Výsledky ukázaly, že jednorázová injekce hormonu snižuje druhý den po aplikaci příjem potravy 20-krát a třetí den 7-krát. Topikální aplikace AKH rovněž snižuje příjem potravy až druhý den po aplikaci, a to 8-krát a třetí den 7-krát. Výsledky opakované aplikace byly nejednotné z důvodů pravděpodobného několikanásobného překročení fyziologických dávek AKH. Pokusy prokázaly, že AKH omezuje příjem potravy nejintenzivněji druhý den po aplikaci, potom jeho účinek klesá. Průkaz omezování příjmu potravy rozšiřuje seznam doprovodných funkcí AKH a podporuje úlohu těchto hormonů v inhibici procesů, které by mohly odčerpávat energii původně uvolněnou na rychlé řešení stresové situace.
Vedoucím práce byl Dr. Dalibor Kodrík, Entomologický ústav BC AVČR a Přírodovědecká fakulta JU, České Budějovice. Práce byla financována z projektu GAČR (DK) 522/07/0788.

P199
Kantoři, nepropadejte panice aneb Interaktivní výuka biologie

Střeleček T.
Gymnázium Boženy Němcové v Hradci Králové
tomas.strelecek@seznam.cz

Teachers, do not panic or Interactive education of biology

The primary aim of the project is to popularize and improve the classwork itself, biology in the concrete, by the vivid methods and mediums. Secondary aim is also the opportunity to downloand all materials for free and the free diffusion of by-us-made didactic utilities.
Our project have begun when we started to observe actual situation in the lessons of biology at the grammar schools. We gathered information (years 2006/2007) and we have found out that the great majority of lessons of biology had all the same groovy systemic course, i. e. display supplemented by illustrational 2D pen-and-ink drawings. Naturally, we arrived at 3D animations. We have created the 3D animations with subtitles (cell, meiosis, mitosis) by the Cinema 4D RS6 program and the multimedia presentations were compiled in Open Office program. At the conclusion, we have built up the internet pages (http://kantori.nepropadejtepanice.com) by PS Pad. By the internet pages we have provided multimedia and interactive portfolio where the products can by downloaded for free.
Toward 500 bodies have downloaded the project. The group of bodies consists of i. a. universities, grammar schools and common users. The aim of the project – to produce vivid, practical, accessible and available didactic utilities (mainly for teachers and students) with relevant scientific information – is pretty successfully proceeding to be fulfilled, being supported by the number of downloads and positive e-mail responses.
Todate, a few similar programs appears, mainly abroad, but we have not found out any for free (lie in franchise). Our work is unique by absolutely free software (by General Public Licence) which is as well used in the case of the applications opening our didactic utilities; and by subtitles in videos. We are planning to continue with the project, videlicet carry on by other multimedia presentations and animations, creating a multimedia textbook.

P200
Chemie, Laboratorní technika

Kunc P.
SOŠ veterinární – Hradec Králové, Kukleny
Kunc.Petr@seznam.cz

Jedná se o PC výukový program, jehož cílem je usnadnit výuku pokusů a vyšetření, probíraných v předmětech chemie a laboratorní technika, přehlednou a především rychlou formou.
Každý pokus a vyšetření je podrobně popsáno – příprava, provedení a vyhodnocení. Nepostradatelnou součástí každého pokusu je videonahrávka, předvádějící přípravu, provedení i vyhodnocení.
Při zpracování byly nejprve natočeny videonahrávky jednotlivých pokusů či vyšetření a shromážděny potřebné materiály. Poté proběhla jejich korekce a sestřih. V poslední fázy proběhl vývoj vlastního programu formou internetových stránek. Díky této formě je jeho ovládání velice jednoduché, a proto postačí běžná uživatelská znalost práce na PC.
Pro bezchybné spuštění programu doporučujeme mít ve Vašem počítači nainstalovány tyto programy: Internet Explorer 7, Java 2.0 a vyšší, Microsoft Media Player 11, CodecPack All in 1 (DivX). Všechny tyto programy jsou součástí výukového programu "Chemie, Laboratorní technika" a lze je dle instrukcí snadno doinstalovat. Jedná se o tzv. freewary, proto je jejich šíření zcela legální.
Do budoucna bych chtěl dopracovat sekci Laboratorní technika dle výukových osnov školy, zdokonalit grafiku programu, doplnit ke všem videonahrávkám audiokomentáře a celý program převést do anglického jazyka.

P201
Infekční systém pro studium mechanismů viroidní patogeneze

Selinger M.
BC AV ČR; Ústav molekulární biologie rostlin; Oddělení molekulární genetiky
m.selinger@seznam.cz

Viroidy jsou malé rostlinné patogenní molekuly RNA bez translační aktivity. Mechanismus viroidní patogeneze však zatím není dosud zcela objasněn. Silně patogenní viroid AS1 (odvozený od PSTVd – Potato spindle tuber viroid) po biolistické inokulaci vyvolává silnou patogenezi jak u rostlin rajčete (L. esculentum cv. Rutgers), tak u rostlin N. Benthamiana.
V naší práci se nám podařilo zkonstruovat expresní rostlinný vektor pLV07(++) s integrovanou viroidní cDNA AS1 v podobě dimerů ve známé orientaci společně s promotorem 35S. Tento vektor se ukázal být silně infekční i pro modelové rostliny N. benthamiana, a to metodou listové infiltrace pomocí transformovaných Agrobacterium tumefaciens (kdy dochází k tzv. transientní expresi). Vektor pLV07(++) tak umožní uplatnit metodu listové infiltrace pro studium mechanismu patogeneze vyvolané viroidními patogeny. Sekvenace finálních konstruktů navíc ukázala silnou stabilitu dimerních AS1, neboť byla prokázána 100% shoda s původní sekvencí AS1.
Dále jsme dokázali, že biolistická inokulace viroidní RNA je účinnější než biolistická inokulace viroidní cDNA (silná redukce stonků u infikovaných rostlin L. esculentum po inokulaci viroidní RNA nebyla pozorována u rostlin infikovaných viroidní cDNA). Vliv promotoru 35S na rychlejší projev patogeneze u infikovaných rostlin L. esculentum nebyl pozorován.

Přednášky

O105
Pathobiochemie tvorby hemu

Martásek P.
Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK v Praze
pavel.martasek@gmail.com

Hem je prostetickou skupinou řady proteinů. Porfyrinový skelet je základem všeho živého – je součástí listové zeleně, červeného krevního barviva, cytochromu, vitamínu B12, myoglobinu a dalších hemoproteinů. Enzymy biosyntetické dráhy hemu jsou vysoce konzervovány v rámci prokaryot i eukaryot. Hem vzniká řadou osmi na sebe navazujících enzymatických kroků. Tato prastará syntetická kaskáda je nastavena tak, že hromadění meziproduktů hemové syntézy je za normální situace omezeno na minimum. Porfyrie jsou skupinou onemocnění s vrozenými defekty v syntéze hemu, jehož dostupnost pro řadu hemoproteinů je u nějtěžších forem porfyrií snížena. Podle tkáně, v níž probíhá akumulace porfyrinů, dělíme porfyrie na erytropoetické, hepatální a erytrohepatální. Jiné dělení akcentuje klinický průběh a rozlišuje porfyrie akutní (akutní intermitentní porfyrie, porfyria variegata, hereditární koproporfyrie, akutní porfyrie s defektem ALA-dehydratázy) a chronické (symptomatická jaterní porfyrie – porfyria cutanea tarda – PCT, dále sem řadíme erytropoetickou protoporfyrii a nesmírně vzácnou Güntherovu chorobu). Jednotlivé porfyrie jsou charakterizovány typickým spektrem vylučovaných porfyrinů, porfobilinogenu a kyseliny delta-aminolevulové. Akutní porfyrie jsou všechny jaterní a jsou přenášeny autosomálně dominantně. Chronické porfyrie jsou typické fotodermatózy a nelze u nich navodit akutní porfyrickou ataku. Během posledních dvaceti let byla charakterizována molekulární podstata porfyrií a popsány mutace, odpovědné za jednotlivé porfyrie. Na příkladu defektu koproporfyrinogen oxidasy (CPO), způsobujícího hereditární koproporfyrii (HK), dokumentujeme pokroky ve studiu molekulární podstaty porfyrií. Klonovali jsme cDNA, popsali organizaci genu pro CPO, první mutaci u nemocné s HK, připravili a krystalovali rekombinantní CPO, určili struktury normálního i mutovaného proteinu a charakterizovali proteiny, nesoucí mutace způsobující HK (podpora granty MSM 0021620806 a 1M0520).

O106
Familární hyperbilirubinemie

Jirsa M.
Laboratoř experimentální hepatologie IKEM, Praha a
milan.jirsa@ikem.cz

Familiární hyperbilirubinémie se obdobně jako žloutenky z jiných příčin dělí na převážně nekonjugované (přímý bilirubin <20% celkového) a převážně konjugované (přímý bilirubin >50% celkového).
Převážně nekonjugované familiární žloutenky Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu a Gilbertův syndrom jsou vyvolány různě závažnou poruchou mol/l. Výsledky naší studie doplněné rozborem publikovaných dat prokázaly, že homozygotní haplotyp [-3279G; A(TA)7TAA] není nezbytným předpokladem pro vznik Gilbertova syndromu. Molekulární diagnostiku Gilbertova syndromu založenou na genotypizaci TATA-boxu tedy nelze nahradit genotypizací lokusu – 3279.konjugace bilirubinu z deficitu UDPG bilirubin glukuronosyltransferázy v důsledku mutací či polymorfismů v genu UGT1A1. Gilbertův syndrom je v Evropské populaci podmíněn dvojicí častých polymorfismů v TATA-boxu a v enhanceru v pozici -3279 promotoru UGT1A1. Molekulární diagnostika Gilbertova syndromu má význam v diferenciální diagnostice hyperbilirubinémie nejasné etiologie přesahující hladinu 100.
Převážně konjugované familiární žloutenky zahrnují Dubin-Johnsonův syndrom vyvolaný mutacemi v genu ABCC2/MRP2 kódujícím bilirubinovou pumpu a Rotorův syndrom, jehož příčina je nejasná. Význam těchto vzácných benigních jednotek je diferenciálně diagnostický: řada postižených před stanovením diagnózy opakovaně absolvuje invazivní vyšetření (ERCP, jaterní biopsie). Vyšetření našich probandů s Rotorovým syndromem neprokázalo žádný deficit ani na úrovni proteinu ABCC2/MRP2 ani na úrovni genu ABCC2/MRP2, což ukazuje, že Rotorův syndrom pravděpodobně není alelickou variantou Dubin-Johnsonova syndromu. Vedle toho byla popsána varianta Dubin-Johnsonova syndromu projevující se smíšenou převážně nekonjugovanou hyperbilirubinémií podmíněná současnou přítomností mutací v genu ABCC2 a polymorfismů v promotoru genu UGT1A1 charakteristických pro Gilbertův syndrom. Pro tuto digenní nosologickou jednotku jsme zavedli název duální hereditární žloutenka.

O107
Protektivní účinky produktů katabolické dráhy

Vítek L.
4. interní klinika a Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze
vitek@cesnet.cz

Bilirubin, hlavní žlučový pigment, je finálním produktem katabolismu hemu v intravaskulárním kompartmentu. Dlouhou dobu se soudilo, že bilirubin nemá žádnou fyziologickou funkci a vždy panovaly obavy z jeho možné toxicity zejména vůči centrálnímu nervovému systému. Ačkoli těžká novorozenecká hyperbilirubinémie může opravdu vést k neurotoxicitě, studie z posledních let dokazují, že bilirubin má celou řadu nových a pro lidský organismus velmi důležitých biochemických a biologických vlastností. Jedná se zejména o antioxidační působení bilirubinu, který je nyní považován za nejsilnější endogenní antioxidant. Těmito vlastnostmi se bilirubin podílí na obraně před rozvojem nemocí sdružených s oxidačním stresem, jako jsou ateroskleróza a některá nádorová onemocnění, stejně tak jako nemoci zánětlivé, autoimunní a neurodegenerativní. Jedinci s Gilbertovým syndromem s charakteristicky zvýšenými hladinami nekonjugovaného bilirubinu mají skutečně nižší výskyt aterosklerotických onemocnění. Naopak, hladiny bilirubinu v séru pod 10 uM představují negativní prognostický faktor srovnatelný s významem HDL cholesterolu v séru. Výsledky experimentálních i klinických studií také naznačují, že aktivace hemoxygenázy, klíčového enzymu v katabolické dráze hemu, vedoucí k produkci bilirubinu a také oxidu uhelnatého, má výrazný protektivní efekt. Oxid uhelnatý představuje molekulu s potentními vazoaktivními vlastnostmi, ovlivňuje také nitrobuněčnou signalizaci a má dokonce i významné antiproliferační vlastnosti. Z těchto důvodů probíhají intenzivní snahy využít katabolické dráhy hemu i terapeuticky buďto indukcí hemoxygenázy, inhibicí biotransformace bilirubinu, nebo suplementací organismu donátory oxidu uhelnatého nebo látkami příbuznými bilirubinu.

O108
Exprese metaloproteinasy 9 (gelatinasy B) u zánětu a nádorové proliferace

Kotyza J., Havel D., Pešek M.
Ústav biochemie LF UK v Plzni; Klinika TRN FN Plzeň
jaromir.kotyza@lfp.cuni.cz

Matrixová metaloproteinasa 9 (MMP-9, gelatinasa B) je největším a svou doménovou skladbou nejsložitějším členem rodiny matrixových peptidas. MMP-9 hraje důležitou roli při remodelaci tkání, růstu a generalizaci nádorů a při rozvoji zánětlivých stavů. Degraduje složky extracelulární matrix a proteolyticky reguluje aktivitu řady rozpustných proteinů. Zevrubně byla sledována MMP-9 u nádorů, kde se uvádí zvýšená exprese u nádorových buněk a/nebo u buněk nádorového stromatu jako výsledek mezibuněčné kooperace. Zvýšení MMP-9 v plasmě je popisováno u řady patologických procesů, zahrnujících kromě maligního bujení také infekci, traumata a nekrosu tkání. Zvýšená exprese je nacházena i u dalších mimobuněčných tekutin, jako jsou např. pleurální a peritotoneální výpotky. U pleurálních tekutin vyvolaných plicními nádory jsme prokázali intenzivní expresi zejména u metastatických nádorů a u nádorů prorůstajících do pleury.
MMP-9 se vyskytuje v extracelulárních tekutinách zejména ve formě proenzymového monomeru, ale také ve formě homoduplexu a heteroduplexu s neutrofilovým lipocalinem (NGAL). V neutrofilech je uložena ve specifických a gelatinasových granulech, ze kterých je po stimulaci uvolňována. U pleurálního zánětu navozeného intrapleurální aplikací talku jsme demonstrovali časné uvolnění všech forem MMP-9, sledované souběžnou produkcí myeloperoxidasy, což podporuje thesi o neutrofilovém původu enzymu v časné fázi zánětu pleurálního prostoru.
Zvýšená exprese MMP-9 u pleurálních afekcí jak na základě nádorové poliferace, tak u zánětlivých stavů, je provázena vzestupem řady klasických ukazatelů zánětu v pleurálních tekutinách. V našem souboru nádorových exsudátů 11 markerů výrazně převyšuje hodnoty transsudátů. Tuto koincidenci lze vysvětlit existencí společných regulačních okruhů. Uvedené nálezy jsou rovněž v souladu s předpokládanou rolí zánětu v kancerogenezi.
Podpořeno VZ MSM 002 162 0819 ČR.

O109
Haemochromatosis – a 2008 update

Powell L. W.
The University of Queensland and the Royal Brisbane and Women's Hospital, Australia
lawrie.powell@qimr.edu.au

The term hemochromatosis is commonly used as synonymous with HFE-associated genetic iron overload but several rarer causes of an identical clinicopathological syndrome have been described in recent years. The most common symptoms are lethargy and arthralgia, and the major complications of end-stage disease are cirrhosis, diabetes, and cardiac and endocrine manifestations. However, with the development of cascade screening for family members of affected probands as well as screening for common diseases at health checks, hemochromatosis is being detected at increasingly early stages, often when there are only biochemical abnormalities. There has been intense recent interest and debate as to the penetrance of the disease (proportion of genetically affected individuals who develop disease) and the natural history in subjects detected early.
The available evidence from screening studies strongly suggests that about 75% of C282Y homozygous subjects have biochemical expression. Hepatic iron overload is present in about 56% and 34% of men and women, respectively, advanced hepatic fibrosis in 18.7% and 5.4%, respectively, and cirrhosis in 5.8% and 1.9%, respectively. In subjects with severe expression of the disease, additional modifying genetic mutations have been described including those in hepcidin and hemojuvelin. Heavy alcohol intake also accelerates and aggravates expression of overt disease with a 10-fold risk of developing cirrhosis in subjects consuming 60g or more per day. Treatment is by regular phlebotomy which, if instituted before the development of cirrhosis, results in normal life expectancy.

O110
Diseases of Flavoprotein Oxidoreductase Deficiency

Marohnic Ch. C.
University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA

In biology, flavin molecules are unique in their ability to couple one and two electron redox reactions. When bound to proteins through hydrogen bonds and stacking interactions with aromatic amino acid sidechains, the common flavin cofactors, flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN), exhibit finely tuned midpoint potentials. These midpoint potentials, along with steric considerations, define the range of electron donor and acceptor molecules with which a flavoprotein interacts. A number of flavoproteins are essential in physiologically important biochemical pathways. Two such examples are NADH-cytochrome b_5 reductase (CB5R) and NADPH-cytochrome P450 reductase (CYPOR). The primary role of CB5R is to provide electrons from NADH for the reduction of methemoglobin to hemoglobin, via cytochrome b_5, in circulating erythrocytes. Failure of this system results in methemoglobinemia. A number of mutations in the human gene encoding CB5R cause Type II Recessive Congenital Methemoglobinemia (RCM). CYPOR supplies electrons from NADPH to 50 microsomal P450 monooxygenase enzymes (involved in xenobiotic and endobiotic transformations), as well as to heme oxygenase (catalyzing the first steps in heme degradation), fatty acid elongase, and squalene monooxygenase. CYPOR deficiency has been implicated in disordered steroidogenesis, Antley-Bixler syndrome, and congenital adrenal hypoplasia. The roles of the flavins and their binding sites in CB5R and CYPOR will be discussed. [Supported by a grant from NIH GM 081658]

Postery

P176
Interference of exogenous bromide with the metabolism of thyroid hormones in the rat

Pavelka S.
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno and Department of Radiometry, Institute of Physiology, ASCR, Prague 4
pav@chemi.muni.cz

Presented is a summary of several of our recent studies on the effects of an enhanced bromide intake in the rats on various aspects of their iodine metabolism. We followed the influence of both an extremely high bromide intake (> 160 mg bromide per animal per day) and also of lower intakes, under conditions of sufficient iodine supply and of iodine deficiency. In addition to adult male rats we used also lactating rat dams and their pups. In the male rats we followed the effects of exogenous bromide on the uptake of 131I-iodide by the thyroid and by various others organs and tissues, as well as on the kinetics of elimination of iodine from the animal's body. In the latter animals, we studied the effects of very high bromide intake in the mothers on their performance in the course of nursing period and on the prosperity of afflicted young.
Excess bromide in the mothers significantly depressed the extent of iodine transfer from the dams to suckling through mother's milk. We have also proved that bromide similarly to iodide readily penetrated into rat milk and via mother's milk was transferred in a large extent into the body of suckling young. Very high intake of bromide in the mothers caused stagnation in the extent of their diet and water consumption in the course of lactation period, and a striking drop in the production rate of mother's milk. As a consequence, a marked decrease in the body weight increments in their young was observed.
Acknowledgements: This work was supported by the Academy of Sciences of the CR (research project AV0Z50110509), by the Ministry of Education of the CR (research project MSM0021622413) and by the Grant Agency of the ASCR (Grant No. KJB401630701).

P177
Štúdium vplyvu glutamátu na DNA krvných lymfocytov po ischémii mozgu u potkana

Kravčuková P., Gottlieb M., Matiašová M., Danielisová V., Némethová M., Burda J.
Neurobiologický ústav SAV, Košice
kravcukova@saske.sk

Cieľom našej práce bolo sledovať dopad globálnej prechodnej ischémie na rozsah poškodenia DNA lymfocytov a zmeny hladiny glutamátu v krvi.
Ischémiu mozgu (10 min) sme navodili metódou štvorcievnej oklúzie. Počas postischemickej reperfúzie sme odoberali vzorky krvi z v. jugularis interna v 20, 40, 60, 90 a 120 min ako aj po 24 hod. Zvieratá prežívali 7 dní za účelom histochemickej analýzy.
Koncentráciu glutamátu sme stanovili reakciou s glutamát dehydrogenázou a analyzovali fluorescenčne. Jedno (SSB) a dvojvláknové (DSB) zlomy molekuly DNA v lymfocytoch sme analyzovali alkalickou, resp. neutrálnou elektroforézou (Comet Assay).
Analýza DNA zlomov ukázala významný nárast SSB (41%) ako aj DSB (65%) po 40 min recirkulácie. Ďalší peak v počte zlomov sme namerali v 120 min postischemickej reperfúzie (SSB 27%, DSB 35,5%). Ku zmenám v koncetrácii glutamátu v krvi (totálna krv, plazma plus bunky) dochádza v rovnakých časových intervaloch. Po 40 – 60 min reperfúzie sme zaznamenali 22,6% nárast oproti hladinám kontroly (191,3±20,14 μmol/l), ako aj druhý cyklus po 120 min (18,8%). Na rozdiel od rozsahu SSBs a DSBs DNA, ktoré po 24 hod klesli na úroveň kontroly, hladina glutamátu dosahovala v tomto časovom intervale maximum (25,2%). Signifikantnú súvislosť (78%) medzi nárastom koncentrácie glutamátu v krvi a zvýšením rozsahu SSB, avšak nie DSB, krvných lymfocytov potvrdila korelačná analýza. Tento výsledok nepriamo potvrdzuje naše pozorovanie, že priebeh poškodenia DNA lymfocytov plynulejšie reprezentovali SSB. Výsledky našej práce ukázali, že ischémia/repefúzia mozgu ovplyvňuje rozsah poškodenia DNA lymfocytov a jedným z vplývajúcich faktorov je zvýšenie hladiny glutamátu v krvi, čo by mohlo byť v budúcnosti využité ako marker mozgového poškodenia.
Práca bola realizovaná za podpory grantov VEGA 2/6211/26, VEGA 2/6210/26 a APVV LPP-023506.

P178

Expression of aromatase mRNA in endometrium from women with and without endometriosis or adenomyosis

Hatok J., Zubor P., Galo S., Kirschnerova R., Dobrota D., Racay P.
Institute of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine in Martin; Clinic of Obstetrics and Gynecology, Jessenius Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Martin, Slovak Republic
hatok@jfmed.uniba.sk

INTRODUCTION: Endometriosis (ENDs) is defined as the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. Adenomyosis (ADNs) is the growth of the endometrium into the muscle layer of the uterus. These pathological conditions are estrogen-dependent diseases. Aromatase cytochrome P450 (CYP19) is the key enzyme in the process of estrogen biosynthesis. The aim of this study was to determine the clinical usefulness of examining endometrial biopsy specimens for aromatase as a diagnostic importance for ENDs and ADNs.
METHODS: Tissue biopsies were obtained from eutopic endometrium. Final inclusion criteria matched 101 women (46 healthy controls, 55 patients). All biopsies were obtained in early proliferative phase of menstrual cycle. The expression of mRNA CYP19 in endometrial specimens was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. mRNA ß-actine was amplified in parallel to exclude loading artifacts and amplification failure.
RESULTS: A significantly increased mRNA aromatase was found in eutopic endometrium of women with ENDs and ADNs compared to healthy controls ($p<0.001$). The mean value of relative aromatase mRNA level in controls was 0.67 (interval 0.02-2.63) compared to patients with ADNs (1.21; 0.1-4.07), ENDs grade I-II (1.14; 0.13-3.15) and grade III-IV (1.65; 0.70-3.52), respectively. These results point on the highest (2.45-fold) difference in aromatase expression in patients with endometriosis grade III-IV compared to controls ($p<0.0001$).
CONCLUSIONS: A significant increased level of mRNA CYP19 expression is present in eutopic endometrium among the healthy women and patients. These findings provide direct evidence that screening for endometrial aromatase in combination with clinical data could be of discriminative value in the prediction of estrogen-dependent diseases. This work was supported in part by grants no. aAV/1106/2004, VEGA 1/3374/06 by Ministry of Education and ESF project.

P179

Dopad mutací v genu pro porfobilinogen deaminázu na biochemické a enzymatické vlastnosti proteinů

Ulbrichová D.
KDDL, 1. LF UK a VFN, Praha, ČR
dana.u@email.cz

Akutní intermitentní porfyrie (AIP, OMIM 176000) je autosomálně dominantní vrozená porucha, která je způsobená částečným snížením aktivity porfobilinogen deaminázy (PBGD, EC 4.3.1.8), třetího enzymu biosyntetické dráhy hemu. Po vystavení organismu s touto poruchou faktorům, které sdílejí schopnost indukovat jaterní enzym syntázu kyseliny 5-aminolevulové, může dojít k nastartování procesu, který vede k potenciálně život ohrožující atace s gastrointestinálními, neurologickými a kardiovaskulárními symptomy. Dvě hlavní hypotézy vysvětlující patogenezi neuroviscerálních symptomů poukazují na nedostatečnost hemu pro formování hemoproteinů a na toxické předávkování organismu prekurzory porfirinů, zejména porfobilinogenem a 5-aminolevulovou kyselinou.
Analyzovali jsme DNA nově diagnostikovaných pacientů a jejich rodinných příslušníků. Bylo objeveno sedm mutací, z toho tři nové (610 C>A, 675 delA, 750 A>T) a čtyři již popsané (76 C>T, 77 G>A, 518 G>A, 771+1 G>T). Pro lepší pochopení vlivu mutací v genu pro PBGD na strukturu proteinu jsme exprimovali konstrukty se zvolenými mutacemi v E. coli. U mutovaných proteinů byli provedeny enzymologické studie. Vzhledem k vysoké sekvenční homologii a podobnosti mezi lidskou PBGD a PBGD z E. coli jsme využili znalosti 3-D struktury enzymu E. coli k předpovězení strukturálně funkčního dopadu mutací na protein.
Tento projekt je rovněž napojen na celoevropské sdružení European Porphyria Initiative (EPI), spojující odborníky jak z řad kliniků, tak i výzkumné pracovníky. Toto sdružení slouží nejen k neustálé výměně informací v oblasti porfyrií, ale zároveň funguje i jako informativní pro pacienty s těmito poruchami (www.porphyria-europe.com).
Výzkum v oblasti vlivu mutací na strukturu a funkci proteinu přináší neocenitelné informace o molekulární podstatě onemocnění a přispívá tak k pochopení dosud zcela neobjasněných procesů odehrávajících se v organismu (Podpora grantem GAUK 257540 54007, MSM0021620806, 1M6837805002).

P180
The role of nitric oxide synthase in pathogenesis of elasticity

Lukáčová N.
Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences
lukacova@saske.sk

Nitric oxide (NO) is a product of the enzymatic conversion of arginine to citrulline by nitric oxide synthase (NOS). The aim of the present study was to examine the role of NOS in the development of spasticity, which is defined as a motor disorder characterized by a velocity-dependent increase in tonic and phasic stretch reflexes. We investigated the level of nNOS protein and nNOS immunoreactivity in medulla oblongata and in L4-S2 segments of the rabbit's spinal cord after transection, performed at lower thoracic level. The transection of the spinal cord was done by making transverse incision on the Th10-Th11 segments using a scalpel blade. Experimental animals survived for 2 and 8 days. Medulla oblongata, the dorsal and ventral horn, and the dorsal and ventral columns were used for Western blot analyses. Interruption of supraspinal input into lower lumbar and sacral spinal cord segments caused significant changes in both the level of nNOS protein and in nNOS immunoreactivity. Remarkable decrease in the level of nNOS protein was noted in medulla oblongata, analyzed 2 and 8 days after spinal cord transection. Similarly, a decrease in the level of nNOS protein was noted in the ventral horn. In dorsal horn, the level of nNOS protein decreased after 2 days of survival, but at the 8th day it tended to increase to control value. The regional changes in nNOS show that NO may play a crucial role in the development of spasticity. These results could be of use in the finding of the therapeutic approaches and treatment of disorders that are connected with the increase of reflex activity, arising as traumatic lesions consequence often overgrowing into serious neurological symptoms.
Supported by APVV 0314-06, VEGA Grant 2/0015/08 and APVT 51-013002.

P181
Srovnání nitritreduktázové aktivity izoforem syntáz oxidu dusnatého při hypoxii

Mikula I., Durocher S., van Faassen E., Mutus B., Slama-Schwok A., Martásek P.
Klinika dětí a dorostu a Centrum Aplikované Genomiky, 1. LF UK, Praha; Laboratory for Optics & Biosciences, INSERM U696, CNRS UMR 7645, Ecole Polytechnique, Palaiseau, France; Department of Chemistry & Biochemistry University of Windsor, Windsor Ontario, Canada; Faculty of Sciences, section Interface Physics, Utrecht University, Netherlands
mikulai@centrum.cz

Dusitanové anionty – nitrity (NO2-) se vyskytují jako metastabilní meziprodukt oxidační kaskády vedoucí od radikálů oxidu dusnatého (NO) ke stabilnímu metabolitu – nitrátu (NO3-). Nedávno byla popsána jejich vazodilatační funkce v cévním systému za hypoxických nebo ischemických podmínek. Jelikož za fyziologických podmínek probíhá nekatalyzovaná redukce velmi pomalu, předpokládá se prezence enzymatických mediátorů. Vzhledem k tomu, že při lokální koncentraci kyslíku menší jak ~10 uM (Km eNOS pro kyslík) je tvorba NO z argininu blokována, redukce nitritů v anoxických podmínkách by mohla poskytnout alternativní zdroj NO v endotelu během akutní hypoxie, resp. ischemie.
Zkoumali jsme schopnost tří izoforem syntáz oxidu dusnatého (NOS) redukovat nitrity na volný NO za anoxických podmínek in vitro, pomocí elektrochemické detekce kombinované s absorpční spektroskopií. Neuronální (nNOS) a inducibilní (iNOS) izoforma za anoxických podmínek při fyziologické koncentraci nitritů (15 uM) žádný NO netvoří, na rozdíl od endoteliální isoformy (eNOS), která redukuje nitrity na volný NO.
Pomocí chemiluminiscenčního detektoru jsme sledovali tvorbu NO vázanou na nitrity v lidských dermálních mikrovaskulárních endoteliálních buňkách (HDMEC). Rychlost tvorby NO za přítomnosti 10 uM extracelulárního nitritu se zvýšila 3.6-krát za hypoxických (~2ppm O2), respektive 8.3-krát za anoxických (argon) podmínek, ve srovnání s podmínkami normoxickými (~22 ppm O2).
Naše data ukazují, že eNOS je jediná izoforma, která tvoří NO nezávisle na koncentraci kyslíku, od normoxických až po anoxické podmínky, při fyziologických koncentracích nitritů. Objem a trvání tvorby NO v HDMEC buňkách v hypoxických podmínkách podporuje teorii o zapojení eNOS do reakce endotelu na akutní ischemii a může vysvětlit ochranný efekt, specificky vázaný na expresi eNOS a popsaný na zvířecích modelech, jako krátkodobé odpovědi na akutní hypoxii.
[Podpořeno granty GAUK 252021 102107, MSMT 0021620806 a EGIDE (ECONET 10275N)]

P182

Mutační analýza genů ATP7A, ATP7B a ATOX1 u nemocných s Menkesovou chorobou a Wilsonovou chorobou v České republice

Pospíšilová L., Králík L., Brůha R., Mareček Z., Flachsová E., Frühauf P., Puchmajerová A., Zeman J., Martásek P.
Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika; 4. interní klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika; Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Česká republika
L.Pospisilova@seznam.cz

Měď je nepostradatelným kofaktorem mnoha enzymů. V lidských buňkách se vyskytují dvě ATPasy účastnící se přenosu mědi: ATP7A a ATP7B a chaperon ATOX1, který k nim měď přináší. Poruchy proteinu ATP7A vedou k rozvoji Menkesovy choroby (MD). Mutace proteinu ATP7B způsobují vznik Wilsonovy choroby (WD). Geny ATP7A a ATP7B vykazují 60% sekvenční identitu a nacházejí se na chromosomech Xq13.3 a 13q14.21. Gen ATOX1 je lokalizován na chromosomu 5q32, zahrnuje 4 exony a zaujímá oblast 16 kb. Předkládáme výsledky mutační analýzy genů ATP7A a ATP7B u 4 nemocných s MD a 120 nemocných s WD z České republiky.
Genomová DNA byla použita k amplifikaci 23 exonů genu ATP7A a 21 exonů genu ATP7B. Produkty PCR byly prověřeny pomocí RFLP a sekvenovány. Zavedli jsme také rychlou metodu pro mutační screening založenou na rozdílech v teplotě tání DNA se sekvenčními odchylkami. U nemocných, jejichž klinický a biochemický fenotyp ukazoval na poruchu transportu mědi, ale u nichž nebyly nalezeny žádné mutace v genech ATP7A nebo ATP7B, jsme provedli také mutační analýzu genu ATOX1.
Molekulární analýza odhalila u nemocných MD v genu ATP7A 4 mutace, z nichž 2 nebyly dosud popsány (Q724X a E1249X). V genu ATP7B bylo u nemocných WD nalezeno 13 mutací. V genu ATOX1 nebyly nalezeny žádné mutace. Molekulární analýza genu ATP7A umožňuje genetické poradenství v rodinách s výskytem MD. Screening pro prevalentní mutaci H1069Q v genu ATP7B ukázal výskyt alely s frekvencí 45,4%, což odpovídá výskytu ve střední Evropě.
Podpořeno granty: IGA MZ NR9406, NR9215, MSMT 1M0520 a GAUK 109/06.

P183

Calcium-dependent nitric oxide synthase activity in the spinal cord after transient ischemia/reperfusion

Schreiberova A., Kolesarova M., Kolesar D., Davidova A., Marsala J., Lukacova N.
Institute of Neurobiology, Centre of Excellence, Slovak Academy of Sciences, Kosice, Slovakia
schreiberova@saske.sk

Nitric oxide (NO) acts as an important non-conventional neurotransmitter in the central and peripheral nervous system, which is generated during conversion of L-arginine to L-citrulline. This reaction is catalyzed by the nitric oxide synthase (NOS). The dynamic of changes in Ca2+-dependent form of NOS activity, which includes both neuronal and endothelial NOS, were observed in the regions of gray and white matter of the rabbit's lumbosacral spinal cord (L4-S4 segments) after transient ischemia/reperfusion injury. Spinal cord ischemia (13, 15 and 17 min) was induced by Fogarty catheter through the femoral artery occlusion of abdominal aorta in the lumbosacral part of spinal cord with a reperfusion period of 24 hours. These ischemia/reperfusion intervals caused a marked deterioration of neurological function of hind limbs and often developed into paraplegia. Calcium-dependent NOS activity was determined by the conversion of L-[14C]arginine to L-[14C]citrulline. We have demonstrated that only the 17 min ischemia alone was sufficient to cause changes in catalytic NOS (cNOS) activity. The ischemic episodes followed by reperfusion caused dynamic, region specific alterations in cNOS activity. The 17 min ischemia followed by 24 h of reperfusion induced an increase in enzyme activity in the dorsal and ventral horns of the gray matter and a decrease in enzyme activity in the dorsal and ventral columns of the white matter. A significant enhancement in cNOS activity in the ventral horns was also detected after the 15 min ischemia followed by 24 h of reperfusion. However, in cNOS activity by 24 h after the 13 min ischemia were observed any alterations. Our results indicate that the motoneurons in the ventral horns respond more sensitively to ischemia/reperfusion than do neurons localized in the other spinal cord regions.

This work was supported by the grants APVV 0314-06 a VEGA 2/0015/08.

P184
Tissue copper content in patients with mutations in cytochrome c oxidase assembly genes

Hansíková H., Veselá K., Stibůrek L. and Zeman J.
Department of Pediatrics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic
hhansikova@seznam.cz

Human mitochondrial cytochrome c oxidase (COX) is composed of 13 structural subunits and contains two copper centers (CuA and CuB) that are essential for enzyme catalytic activity. So far, pathogenic mutations was described only in two (SCO1 and SCO2) from several accessory factors that are essential for copper delivery to COX.
Aim of our study was to analyze copper content in muscle, liver, heart and brain from patients with COX deficiency due to mutations in nuclear encoded assembly factors and to compare the copper content with biochemical impact in various tissues.
Material and methods: Analysed group consist of 10 patients with COX deficiency and mutations in SCO1 (1x c.394G>A/c.394G>A), SCO2 (3x 1541G>A/1541G>A, 1x1280C>T/ 1541G>A, 1x 1518delA/1541G>A) and SURF1 (c.790_792delCT/c.845_846delCT, c.312insATdel10/c.821del18, c.668C>T/c.668C>T, c.469C>T/c.845_846delCT). Copper content was analysed by AAS (atomic absorption spectrophotometry). The activity and amount of COX were analysed spectrophotometricaly, 2D Blue-Native electrophoresis and western blotting.
Results: The Sco1 deficient muscle sample showed profoundly decreased copper content to 20% of age related controls. Similarly, also the various Sco2 deficient tissue samples showed very low copper content, with the heart samples being the most affected (33% of controls). This low copper content in heart from SCO2 patients corresponded well with the most decreased COX activity. Surprisingly, the copper content of Surf1 deficient tissues was also significantly decreased.
Conclusion: While the copper-deficient phenotype of SCO1/SCO2 tissues appears consistent with the function of both gene products in regulation of cellular copper homeostasis, the severe copper deficiency of Surf1-deficient tissues remains elusive.
Supported by GACR 303/07/0781

P185
Metabolizmus niektorých stopových prvkov u detí s ochorením Hyperkinetická porucha aktivity a pozornosti

Viktorínová A., Trebatická J., Chovanová Z., Ursínyová M., Uhnáková I., Ďuračková Z.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská Republika; Klinika detskej psychiatrie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská Republika; Laboratórium toxických a esenciálnych prvkov, Slovenská zdravotnícka Univerzita, Bratislava, Slovenská Republika
alena.viktorinova@fmed.uniba.sk

Hyperkinetická porucha aktivity a pozornosti (ADHD) je rozšírené neurobehaviorálne ochorenie zapríčinené genetickými a biologickými faktormi a vplyvmi vonkajšieho prostredia (ťažké kovy), ktoré pretrváva do adolescencie až dospelosti. Pycnogenol® je štandardizovaný extrakt z kôry francúzskej prímorskej borovice Pinus pinaster, ktorý obsahuje prokyanidíny, katechín, taxifolinu a fenolické kyseliny a prejavuje antioxidačné, chelatačné a iné vlastnosti.
V klinickej štúdii (randomizovaná, double-blind, placebo-kontrolovaná) sa sledoval vplyv 1 mes. suplementácie Pycnogenolu®/placeba (1 mg/kg/day) na hladiny Cu, Zn, Se, Fe, feritínu, transferínu (plazma) a Pb (celá krv) u 75 detí s ADHD (6-14 rokov). Kontrolnú skupinu tvorilo 56 zdravých detí (6-14 rokov).
U detí s ADHD sa zistili znížené hladiny Zn ($P < 0.05$), zvýšený pomer Cu/Zn ($P < 0.05$) a zvýšené hladiny Cu a Pb vzhľadom na kontrolnú skupinu detí. Se, Fe, feritín a transferín boli v rozsahu fyziologických hodnôt. Po podávaní Pycnogenolu® poklesli hladiny Cu ($P < 0.01$), pomer Cu/Zn ($P < 0.05$), Fe ($P < 0.05$) a Pb (nesignifikantne). Nepozoroval sa signifikantný vplyv Pycnogenolu® na hladiny Zn, Se, feritínu a transferínu.
Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že Pycnogenol® modifikoval metabolizmus stopových prvkov (zníženie hladín Cu, Fe a Pb) a zlepšil celkový antioxidačný stav a klinické symptómy detí s ADHD. Pycnogenol® môže svojou chelatačnou schopnosťou a ďalšími účinkami spomaliť progresiu ochorenia a prispieť k zlepšeniu klinických prejavov u detí s ochorením ADHD.
Štúdia bola sponzorovaná z grantov: USA/Slov/TW-010002, VEGA grant MŠ SR 1/1157/04, MVTS grant MŠ SR TW-010002 a občianským združením Rozum a zdravie.

P186
Stanovenie asymetrického dimetylarginínu metódou plynovej chromatografie v sére

Vozár I.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská Republika; Medifera, Neštátne zdravotnícke zariadenie, Bratislava, Slovenská republika
igor.vozar@fmed.uniba.sk

Endotel, ako najväčší endokrinný orgán v ľudskom tele, zohráva významnú úlohu v rôznych fyziologických procesoch, regulácie krvného tlaku a produkcie bilologicky aktívnych látok. K poruche funkcie endotelu alebo poškodeniu dochádza pri rôznych ochoreniach ako je napr. ateroskleróza, hypertenzia, diabetes mellitus, dyslipoproteinémia a starnutie obličiek. Jedným z prejavov ochorenia je endotelova dysfunkcia.
Oxid dusnatý (NO; nitrogen oxid) významne ovplyvňuje fyziologické protizrážacie, protizápalové a antiproliferatívne vlastnosti endotelu. Endogénny oxid dusnatý sa tvorí enzymatickou konverziou L-arginínu na L-citrulín, pričom reakciu katalyzuje syntáza oxidu dusnatého (NO-syntáza).
NO-syntáza sa v bunkách nachádza v troch izoformách (neurónovej, endotelovej a indukovateľnej). Endotelová NO-syntáza je zdrojom NO, ktorý preniká do okolitých buniek hladkého svalstva ciev a aktivuje enzým guanylátcyklázu. Najvýznamnejším kompetitívnym inhibítorom NO-syntázy je asymetrický dimetylarginín (ADMA), ktorý sa považuje za nový biochemický marker aterosklerózy. ADMA paradoxne nevzniká v organizme priamo z L-arginínu, ale degradáciou bielkovín bunkového jadra s následnou posttranslačnou modifikáciou enzýmu argininmetyltransferázy I, ktorý katalyzuje jeho tvorbu.
V našej práci sme pripravili metodiku stanovenia asymetrického dimetylarginínu pomocou plynovej chromatografie v sére.
Metodika stanovenia:
- odobratie vzoriek, izolácia plazmy
- príprava n-butyl-trifluoroacetyl derivátov ADMA
- plynová chromatografia-sklená kolóna plnená 3% OV-3 na Chromosorb WAW (80-100 mesh)
- programovaná teplota od 80-320 °C, 2 min držanie, 25 °C/min, 5 min držanie
- kalibračná krivka v rozsahu 0,5-10 nmol/l ADMA

P187
Dubin-Johnsonův a Gilbertův syndrom ve Slovenské populaci, první popis současné homozygozity

Barnincová L., Behúnová J., Martásek P.
Klinika dětského a dorostového lékařství 1LF UK; Dětská fakultní nemocnice Košice
lenka.barnincova@seznam.cz

Hereditární hyperbilirubinémie jsou vrozené poruchy některého z enzymů účastnících se degradace hemu. Konjugace bilirubinu v hepatocytu je katalyzována enzymem glukuronosyltransferázou (UGT1A). Defekty v genu UGT1A1 způsobují redukci transkripce a následně sníženou aktivitu enzymu. To je podstatou Gilbertova syndromu (GS). GS je dědičná autosomálně recesivní hyperbilirubinémie s frekvencí 5-10% v kavkazské populaci, zapříčiněná primárně inzercí TA nukleotidů v TATAA boxu genu UGT1A1. Hyperbilirubinémie je nekonjugovaná, mírná, kolísavá. Exkreci konjugovaného bilirubinu z hepatocytu zprostředkovává protein MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2). Mutace v klíčové oblasti MRP2 genu způsobují poškození maturace a distribuci mutovaného proteinu z endoplazmatického retikula do Golgiho komplexu. To vede ke konjugované hyperbilirubinémii, Dubin-Johnsonovu syndromu (DJS), který je charakterizován zvýšenou hladinou konjugovaného bilirubinu v séru a zvýšeným vylučováním koproporfyrinu I v moči. Jedná se o vzácné autosomálně recesivní onemocnění. Cílem bylo charakterizovat příčiny nepravidelně se vyskytující hyperbilirubinémie a identifikovat mutaci způsobující poruchy eliminace bilirubinu ve třech generacích rozsáhlé romské rodiny. Pomocí metod molekulární biologie (PCR, sekvenování) jsme v genu MRP2 identifikovali dosud nepopsanou mutaci 1012delGT, která způsobuje posun čtecího rámce a vede ke konjugované hyperbilirubinémii Dubin-Johnsonova typu. Dále byl v rodině zaznamenán výskyt TA inzerce v TATAA boxu genu UGT1A1, způsobující Gilbertův syndrom. Nepravidelný výskyt ikteru byl vysvětlen kombinací obou recesivních syndromů Dubin-Johnsonova a Gilbertova. 6 členů rodiny neslo mutaci v MRP2 genu homozygotně, z toho 2 byli navíc homozygotní nosiči TA inzerce v genu UGT1A1. Naše práce je prvním popisem kombinace Gilbertova a Dubin-Johnsonova syndromu s homozygotními mutacemi v obou genech současně.Dekuji za podporu grantum MSM 0021620806 a 1M0520.

P188
Produkty pokročilej glykácie a oxidácie proteínov a usCRP u pacientov s Downovým syndrómom

Krivošíková Z., Šustrová M., Spustová V., Štefíková K.
Oddelenie experimentálnej a klinickej biochémie, Oddelenie imunológie a imunotoxikológie, Slovenská zdravotnícka unuverzita, Bratislava, Slovensko
zorka.krivosikova@szu.sk

Úvod: Pri zvýšenom oxidačnom strese dochádza aj k zvýšenej tvorbe produktov pokročilej glykácie (AGEs) a oxidácie proteínov (AOPP). Pacienti s DS majú často trpia obezitu a poruchu metabolizmu glukózy, čo býva spojené nielen so zvyšujúcimi sa AGEs a AOPP ale aj so zvýšenými sérovými koncentráciami prozápalového cytokínu CRP. Cieľom našej práce bolo stanoviť sérové koncentrácie AGEs, AOPP a usCRP a zistiť ich vzťah k parametrom glukózového a lipidového metabolizmu u pacientov s DS.
Metódy: Vyšetrili sme 102 pacientov s DS, 50 žien a 52 mužov. U všetkých sme stanovili sérové koncentrácie lipidov (Chol, LDL, HDL, TAG), glukózu, inzulín, AGEs, AOPP, usCRP a vypočítali sme BMI a index na hodnotenie inzulínovej rezistencie Quicki.
Výsledky: Priemerné sérové koncentrácie glukózy a lipidov boli v referenčnom rozsahu. Muži mali v porovnaní so ženami nižší HDL cholesterol ($p<0.01$) a vyššie TAG ($p<0.05$). Priemerné hodnoty Quicki sa pohybovali v oboch skupinách v oblasti inzulínovej rezistencie. Inzulín-senzitívnych bolo 31% probandov a inzulín rezistentných 69%. Priemerné hodnoty usCRP boli v oboch skupinách zvýšené oproti referenčnému rozmedziu. Muži mali vyššie AOPP, AGEs boli v oboch skupinách rovnaké. Regeresnou analýzou sme zistili významné závislosti AOPP s BMI, Quicki, usCRP, Chol, LDL a HDL a AGEs s usCRP, Chol a LDL.
Záver: DS je rizikový faktor pre metabolický syndróm a kardiovaskulárne ochorenia. V našom súbore až 51% pacientov malo nadváhu a obezitu, pričom prevalencia inzulínovej rezistencie bola až 69%. Na týchto zmenách sa môže podieľať aj vyšší oxidačný stres čo sme doložili významnými koreláciami AOPP a AGEs s markermi zápalu, koncentráciou lipidov a inzulínovou rezistenciou.
Táto práca bola podporená grantom Ministerstva zdravotníctva č.2005/39-SZU-17

P189
Kostný metabolizmus u vegetariánok

Krivošíková Z., Krajčovičová-Kudláčková M., Spustová V., Štefíková K., Valachovičová M., Dzúrik R., Němcová T.
Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie, Oddelenie bioaktívnych látok a nutričného skríningu, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, Trnavská univerzita, Trnava, Slovensko
zorka.krivosikova@szu.sk

Úvod: Vplyv vegetariánskej výživy na kosť pri nedostatočnom príjme minerálov, vitamínov a bielkovín môže byť negatívny, hlavne v prípade detí a adolescentov, u ktorých sa kostná hmota ešte len buduje. Cieľom našej práce bolo zistiť prevalenciu deficitu vitamínu D a jeho vzťah k hustote kostí a kostnému metabolizmu u zdravých mladých a postmenopauzálnych vegetariánok.
Metódy: Vyšetrili sme 131 zdravých dobrovoľníčok, z toho 77 vo veku 20-30 rokov (A) a 54 vo veku 60-70 rokov (B). U všetkých žien sme stanovili sérové koncentrácie iPTH, 25(OH)vitamín D a kostné markery. Hustotu kostí (BMD) sme merali v oblasti krčku femuru, trochanteru a lumbálnej chrbtice. Všetkým ženám sme tiež stanovili BMI.
Výsledky: Zistili sme významné rozdiely vo výške, hmotnosti, BMI, PTH, FBMD, TrBMD a L1-4BMD v závislosti od veku. Menej ako 5% žien v oboch skupinách malo odporúčané sérové koncentrácie vitamínu D $\geq$30 ng/ml. Staršie ženy mali významne vyššie sérové koncentrácie ALP, ALPk a PTH v porovnaní s mladšími ženami. V oboch skupinách boli mierne zvýšené koncentrácie kostných markerov. Lineárnou regresnou analýzou sme nepotvrdili závislosť BMD ani v jednej z meraných oblastí od koncentrácie vitamínu D. V celom súbore sme zistili významnú koreláciu medzi PTH a vitamínom D a medzi BMD femuru a lumbálnej chrbtice a PTH. Pozitívnu koreláciu medzi BMD krčku femuru a trochanteru s BMI sme potvrdili v skupine A a koreláciu medzi BMD femuru s BMI v skupine B.
Záver: V sledovanej skupine žien sme potvrdili vysokú prevalenciu hypovitaminózy D a zvýšený kostný obrat hlavne u starších žien spojený aj so zvýšenými koncentráciami parathormónu. Z tejto pilotnej štúdie možno predpokladať, že na zistených zmenách sa môže podieľať vegetariánsky životný štýl. Na potvrdenie tohto predpokladu je potrebná kontrolovaná klinická štúdia porovnávajúca bežnú populáciu s vegetariánmi.
Táto práca bola podporená grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVT-21-010104 a APVT-21-017704.

P190
Vplyv hypogonadizmu na kostnú hustotu u mužov s Downovým syndrómom

Šustrová M., Krivošíková Z., Spustová V., Štefíková K.
Oddelenie imunológie a imunotoxikológie, Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, Slovensko
maria.sustrova@szu.sk

Úvod: Hypogonadizmus predstavuje významný rizikový faktor vzniku a rozvoja mužskej osteoporózy. U mužov s Downovým syndrómom (DS) je popísaný vyšší výskyt hypogonadizmu než v zdravej populácii. Tiež sú známe údaje o vyššom výskyte zníženej kostnej hustoty u pacientov s DS už v mladšom veku. Cieľom našej práce bolo zistiť vzťah medzi folikulo-stimulačným hormónom (FSH), dehydroepiandrosterón-sulfátom (DHEA-S) a testosterónom (T) a kostnou hustotou u mužov s Downovým syndrómom.
Metódy: V skupine DS (n=52) a kontrolnej skupine (K, n=40) sme vyšetrili sérové koncentrácie FSH, DHEA-S a testosterónu. V oboch skupinách sme tiež vyšetrili hustotu kosti (BMD) v oblasti krčku femuru (F), trochanteru (Tr) a lumbálnej chrbtice (L1-4).
Výsledky: Priemerné koncentrácie DHEA-S a T boli v referenčnom rozmedzí v oboch skupinách. Skupiny sa medzi sebou nelíšili v koncentráciách T, ale v skupine DS boli kncentrácie DHEA-S významne nižšie ako v kontrolnej skupine ($p<0,001$). Koncentrácie FSH v skupine DS prekračovali referenčný rozsah a boli významne vyššie ako v kontrolnej skupine ($p<0,001$). BMD bola vo všetkých troch sledovaných miestach významne nižšia v skupine DS ($p<0,001$). Regresnou analýzou sme zistili významnú inverznú koreláciu FSH s BMD vo všetkých sledovaných oblastiach. Hustota kostí tiež významne pozitívne korelovala s koncentráciami DHEA-S v oblasti F a L1-4. Tieto výsledky sme potvrdili aj univariátnou analýzou.
Záver: Výsledky tejto štúdie ukazujú, že muži s DS majú nižšiu hustotu kostí než zdraví muži. Na základe získaných výsledkov môžeme potvrdiť, že jedným z faktorov ktoré ovplyvňujú stav BMD u týchto pacientov je aj hypogonadizmus. Znížené koncentrácie DHEA-S, ktorý slúži ako prekurzor pre tvorbu testosterónu a androsterónu spolu so zvýšenými koncentráciami FSH majú pravdepodobne priamy účinok na zvýšenú resorpciu kosti, čo dokladajú aj niektoré lierárne údaje.
Táto práca bola podporená projektom Ministerstva zdravotníctva SR (č.2005/39-SZU-17).

P191
Glycation of aspartate aminotransferase by methylglyoxal; effect of selected antioxidants

Boušová I., Bacílková E., Dršata J.
Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové
Iva.Bousova@faf.cuni.cz

Non-enzymatic glycation is a process in which reducing sugars bind to free amino groups of protein and advanced glycation end-products (AGEs) are formed. That results in the impairment of protein functions during diabetes mellitus and age-related diseases. Several oxidative steps are also included. Methylglyoxal (MGO), the reactive dicarbonyl compound formed in the course of glycation, participates in the intracellular glycation process.
Effects of hydroxycitric acid, aminoguanidine, and uric acid in various concentrations (1 μM – 10 mM) on glycation of aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) by MGO in the in vitro model were tested. AST was incubated with 0.5 mM MGO at 37°C in the absence or presence of antioxidant for up to 7 days. Enzyme activity (kinetic UV method), absorption UV-VIS spectra and formation of fluorescent AGEs ($\lambda ex/\lambda em$ 370/440 nm for total AGEs and $\lambda ex/\lambda em$ 335/385 nm for pentosidine) were taken as the criteria of the course of glycation. Cross-linking and aggregation of AST caused by MGO was investigated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).
Methylglyoxal caused 65% decrease of the AST activity after 4 hours of incubation. This decrease was partially reversed by hydroxycitric acid 2.5 mM or aminoguanidine 1 mM. Latter compound also prevented formation of AGEs as was seen at fluorescence and absorption UV-VIS spectra of AST. Aminoguanidine also prevented cross-linking and aggregation of AST caused by MGO as was seen at SDS-PAGE. Uric acid had no effect on glycation of AST by MGO.
Acknowledgements: Supported by the Development project of Czech Ministry of Education No. 141/2008.

Přednášky

O111
Kompletní genomová sekvence bakterie Rhodobacter capsulatus SB1003

Strnad H., Vlček Č., Pačes J., Ulbrich P., Kolář M., Lapidus A., Maltsev N., Kogan Y., Kumar V., Fonstein M., Pačes V., Haselkorn R.
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.; Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.; Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.; Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.; Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago; Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago; Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago; Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago; Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago; Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.; Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago
strnad@img.cas.cz

Rhodobacter capsulatus patří do skupiny purpurových nesirných bakterií (třída alfa-proteobakteria), které jsou schopné fotosyntetického růstu a fixace vzdušného dusíku. Sekvenační projekt byl zahájen v roce 1995 přípravou kompletní kosmidové knihovny a přesné restrikční mapy genomu. Ke stanovení celkové nukleotidové sekvence byla použita strategie sekvenování kosmidových klonů, která byla v závěru projektu doplněna metodami cíleného. Výsledný genom s vysokým obsahem GC (66.7%) se skládá z cirkulárního chromozómu o velikosti 3.7 Mb a plasmidu o velikosti 133 kb.
Analýzou sekvence bylo identifikováno 3664 strukturních genů, čtyři operony pro rRNA, 53 tRNA genů a jeden gen kodující tmRNA. Jednotlivé geny byly analyzovány a v přibližně 70% případů jim byla přidělena předpokládaná biologické funkce. Na základě funkce byly geny zařazeny do funkčních skuoin (COG, "TIGR roles"). Rekonstrukce metabolických drah byla provedena modulem "Pathologic" v programu ”Pathway Tools”. Zvláštní zřetel byl během analýzy věnován výskytu kryptických profágů a jejich lokalizaci.

O112
Antigenní peptidy prezentované HLA-B2705 molekulou jsou generovány vyštěpením z proteinů v oblasti s charakteristickými strukturními vlastnostmi

Pánek J., Kolář M., Vomastek T., Stodůlková E., Flieger M.
Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; Ústav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4; Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
kolarmi@img.cas.cz

HLA-B27 antigen prezentuje krátké peptidy odvozené z intracelulárních proteinů cytotoxickým T-lymfocytům. Exprese HLA-B27 je spojena s častějším výskytem některých autoimunitních chorob tzv. spondyloarthropathií (SpA), např. ankylozující spondylitida (AS nebo “Bechtěrev”). Charakterizace specifických strukturních požadavků, nezbytných pro generování peptidů prezentovaných molekulou HLA-B27, může výrazně přispět k porozumění mechanizmu specifické imunitní odpovědi a rozvoje některých autoimunitních onemocnění.
Nedávno publikované sekvence peptidů (82)[1] získané elucí z HLA-B2705 molekul zdravého krevního dárce byly použity pro sekvenční a strukturní bioinformatickou analýzu. Ačkoliv nebyla pozorována žádná podobnost na úrovni primární sekvence proteinů, sekundární a terciární struktura v okolí peptidů vykazovala konzervované znaky charakterizované následujícími vlastnostmi: 1. v oblasti generovaného peptidu docházelo k přechodu v sekundární struktuře, 2. terciární struktura byla v této oblasti zlomená a 3. peptid byl lokalizován na povrchu proteinu. Navíc bylo zjištěno, že proteinové sekvence byly v okolí generovaných peptidů silněji konzervovány než v obecných pozicích.
Přechod v sekundární struktuře a lokalizace na povrchu proteinu jsou první statisticky významné vlastnosti okolí peptidů, které jsou prezentovány HLA-B2705. Aplikace těchto vlastností proteinů usnadní a upřesní predikci sekvencí peptidů prezentovaných na HLA molekulách, a umožní optimalizovat design syntetických peptidů používaných v humánní medicíně.

[1] Stodůlková E., Novák P., Deininger S.O., Man P., Čapková J., Kavan D., Ivašková E., Flieger M.: LC MALDI-TOF MS/MS and LC ESI FTMS analyses of HLA-B27 associated peptides isolated from peripheral blood cells. Immunol.Lett. 116, 79-85 (2008).

O113
Umělá inteligence a prostředí Mathematica v bioinformatice

Zelinka I., Lexa M., Snášel V.
Ústav aplikované informatiky; Fakulta aplikované informatiky; Univerzita Tomáše Bati;Zlín
zelinka@fai.utb.cz

Příspěvek se zabývá demonstrováním vybraných metod z oblasti umělé inteligence v oblasti bioinformatiky. V první části budou načrtnuty aplikace vybraných metod umělé inteligence na problémech bioinformatiky jako je syntéza metabolických cest, identifikace genových regulačních sítí atp. Součástí přednášky bude i demonstrování použitelnosti prostředí Mathematica na bioinformatické operace, včetně 3D vizualizací a jejich možné použití s vybranými algoritmy umělé inteligence.

O114
Systém pro odhad entropie a detekci struktury v proteinových sekvencích

Bystrý V., Lexa M.
Fakulta informatiky, Masarykova Univerzita
vojtab@mail.muni.cz

Pořadí aminokyselin v proteinech není náhodné. Jejich uspořádání nese informaci o struktuře a funkci daného proteinu a má některé vlastnosti jazyka (označuje se pojmem biologický jazyk). Teorie informace dokáže vyjádřit lokální informační obsah sekvence pomocí entropie. Tam kde je hodnota entropie nízká, je možné sekvenci komprimovat na velikost odpovidajici informačnímu obsahu. U reálných sekvencí lze entropii odhadovat za pomoci různých modelů sekvence. Čím ňižší je odhad entropie, tím lépe dané modely vystihují vztahy mezi jednotlivými pozicemi v sekvenci.
Predstavime program pro odhad entropie proteinových sekvencí pomocí tzv. "statictických expertů". Jsou to modely sekvence navrženy tak aby pokrývali typické sekvenční a strukturní vlastnosti proteinů (například model pro hledání periodických opakování nebo model pro hledání rozptylenych opakování kratsich motivu). Tyto modely lze navíc hierarchicky navazovat a je tak umožněno hledání nových, složitějších strukturních souvislostí nebo souvislostí na delší vzdálenosti v sekvenci. Program je modulární a poskytuje informace o použití jednotlivých modulů pro danou pozici v sekvenci (symbol). Je tak vhodný pro podrobnou analýzu strukturních vlastností sekvence z pohledu entropie a míry informace za účelem jejich porovnání s vlastnostmi daného proteinu.
Měřeno schopností komprese realných biologických sekvencí pomocí aritmetického kódovani dosahuje program kvalitu porovnatelnou s nejnovějšími nástroji podobného typu.

O115
Molekulární modelování pomocí metadynamiky

Spiwok V., Tvaroška I.
Chemický ústav SAV – Centrum glykomiky
chemspiw@savba.sk

Studium chemických a biologických systémů pomocí metod molekulárního modelování je v mnoha případech komplikováno faktem, že studovaný děj probíhá v časovém měřítku přesahujícím možnosti dnešní výpočetní techniky. Jedná se například o konformační změny, sbalování proteinu, interakce proteinu s nízkomolekulárními ligandy atd. Abychom mohli tyto děje studovat, je nutné nějak systému "pomoci" překonat energetické bariery. Metadynamika je poměrně nová metoda, která tento problém řeší tak, že simuluje dynamiku systému a při tom "zaplavuje" již navštívená minima energie. Takto přidany zaplavovací potenciál umožňuje systému překonat energetické bariery a zároveň umožňuje předpovědět termodynamiku a kinetiku studovaných dějú. Zde presentujeme teoretický základ metadynamiky spolu s příklady naše aplikace této metody při modelování konformačních změn peptidú, sacharidú a dalších systémú.

Tato práce vznikla v rámci projektu REVCAT (MRTN-CT-2006-35866-2) jako součást Marie Curie Research Training Networks.

O116
Prohledávání genomových sekvencí s podporou v hardware

Lexa M., Martínek T.
Fakulta informaVních technologií, MU Brno
lexa@fi.muni.cz

S hromaděním sekvenčních dat narůstají možnosti jejich analýzy i výpočetní náročnost takových analýz. Jednou z cest zrychlení výpoctů je použití heuristik nebo předpočítání vhodných dat na genomech. Nevýhodou tohoto postupu je nutnost uchovávat různě předpočítaná data, a nepružnost v případě změny původních dat či parametrů samotného výpočtu. Zajímavou alternativou je proto akcelerovat kritickou část složitých výpočtů do takové míry, aby se dal příslušny výpočet provést v reálném čase v momentě, kdy uživatel potřebuje výsledky a zná přesná nastavení případných parametrů. Pravděpodobně nejfrekventovanější operací v analýze sekvenčních dat je vyhledávání kratších sekvencí určitých vlastností. Ukážeme příklady identifikace sekvenčních vzorů se zaměřením na tvorbu sekundárních struktur v DNA, možnost podpory hledání v hardwaru a aplikace, kde je možné zrychlené hledání využít.

Přednášky

O116A
Vítězka Ceny Arnolda Beckmana – proteomika (Helena Skalníková): Studium diferenciace nervových kmenových buněk pomocí proteomických metod

Skalníková H., Halada P., Vodička P., Motlík J., Řehulka P., Horning O., Chmelík J., Jensen O. N., Kovářová H.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. a Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, Česká Republika
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Česká republika
University of Southern Denmark, Dánsko
Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Česká republika

Nervové kmenové buňky jsou přítomny ve vyvíjejícím se i dospělém centrálním nervovém systému (CNS) a mohou sloužit k náhradě nervových buněk ztracených či poškozených vlivem úrazu nebo onemocnění. Tyto buňky představují velkou naději pro léčbu poruch CNS, jako jsou poranění míchy a neurodegenerativních onemocnění (např. Parkinsonova nebo Alzheimerova nemoc). V CNS jsou kmenové buňky udržovány v nediferencovanémstavu a teprve během své diferenciace získávají specifické vlastnosti funkčních neuronů a gliových buněk. Pro lepší porozumění molekulárních mechanizmů diferenciace nervových buněk byla v této práci použita analýza proteomů prasečích fetálních nervových kmenových buněk.
Nejprve byly pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy mapovány proteiny konstitutivně přítomné v nervových buňkách. Zde byly hmotnostní spektrometrií nejčastěji identifikovány proteiny účastnící se metabolismu a úprav RNA a proteinů včetně chaperonů, následované proteiny podílejícími se na buněčné organizaci (cytoskelet a anexiny). Poté byly porovnány rozdíly v hladinách proteinů mezi kmenovými buňkami a diferencovanými nervovými buňkami (neurony, astrocyty a oligodendrocyty). Velká část těchto rozdílů zahrnovala proteiny podílející se na modifikacích a transportu mRNA (např. hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP H). Dále byly identifikovány proteiny účastnící se odpovědí na stres, skladování železa a regulace redox potenciálu. Zvyšování hladiny hnRNP A1, hnRNP A2/B1 a α-B-crystallinu během diferenciace bylo potvrzeno použitím imunoblotu a buněčná lokalizace těchto proteinů v různých typech nervových buněk byla sledována imunocytochemicky.
Pro získání kompletnějšího pohledu na změny v proteomu nervových kmenových buněk byla technika dvojrozměrné gelové elektroforézy doplněna použitím proteinových mikročipů. Mikročip umožňuje kvantifikovat více než 650 signálních molekul a jejich fosforylací. Významné změny nalezené pomocí mikročipu byly dále ověřeny imunoblotem. Pro diferencované nervové buňky byly typické zvýšené hladiny RafB, MEK3, heme-oxygenasy 2 a protein-fosfatasy 4C. Naopak, kmenové buňky vykazovaly vyšší hladiny G protein-coupled receptor-serine kinasy 2 a zvýšené fosforylace αB-crystallinu (S45), proteinkinas C γ (T655) a PKCμ (S738+S742) a translačního faktoru eIF2α (S51).
Tyto výsledky představují významný krok k pochopení regulačních cest, které řídí diferenciace nervových buněk a vybrané zúčastněné proteiny jsou potenciálními kandidáty pro kontrolu diferenciace nervových buněk v rozvíjející se oblasti buněčné terapie.
Tato práce vznikla za finanční podpory Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad (1M0538) a ústavních výzkumných záměrů ÚŽFG (AV0Z50450515) a MBÚ (*AV0Z50200510).*

O117
Kvantifikace proteinové exprese u CEM buněk v průběhu protinádorové terapie akutní T lymfoblastické leukémie

Pompach P., Novák P., Man P., Nedvěd J., Havlíček V., Džubák P., Hajdúch M.
Institute of Microbiology, Prague, CZ; Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc, CZ
pompach@biomed.cas.cz

The aim of this research concerns the proteomic profiling of cancer cells with a perspective towards a new diagnostic and treatment modalities, particularly individualized/personalized therapy and targeted therapy of tumors and complications associated with them. The main topics of interest involve the modulation of gene expression, induction of multidrug resistance, proteomic signatures of anticancer drugs in treated cancer cells, diagnostic, prognostic and predictive significance of selected genes in tumors or patient populations and developments of novel methods for identification of tumor-drug interactions.
The control CEM (Human acute lymphoblastic T-cell leukemia) cells were labeled by heavy lysine and arginine. The experimental CEM cells were incubated with taxol in a regular medium. Before the lysis, control and treated cells were mixed together keeping a 1:1 ratio. Combination of preparative electrophoresis and LC FT-MS/MS was used for the protein analysis.
The control CEM cells were succesfully labeled. The incorporation of 13C lysine and arginine was almost 100% after the fifth passage. The optimal conditions for cells' harvesting were those after the caspase 9 activity reached 25% (Western blot check). The lysate of 10^7 cells were loaded on preparative gradient (7-15%) polyacrylamide gel. After the separation the gel was sliced to 2 mm thick fractions. Each fraction underwent the in-gel tryptic digestion. Peptide mixture was loaded onto the capillary C18 reverse phase column on-line connected to the high resolution mass spectrometer. Peptides were eluted in water/acetonitrile gradient, full and product ion mass spectra were recorded. Instrument was externally calibrated using arginine clusters and typical error below 1 ppm in MS and MS/MS modes was achieved. The obtained data were interpreted using WARP LC, BioTools and DataAnalysis software packages. Several hundreds proteins were successfully identified.

O118

Proteom buněk odvozených z metastazujících a nemetastazujících nádorů prsu; hledání nových prognostických faktorů

Selicharová I., Smutná K., Šanda M., Matoušková E., Coufal D., Vydra J.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague; Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague; Department of Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague; Institute of Computer Science, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague
selicharova@uochb.cas.cz

Breast carcinomas represent a heterogeneous group of tumors diverse in behavior, outcome, and response to therapy. Despite extensive research and advances in treatment, the outcome of patients with breast cancer has still not sufficiently improved. Identification of proteins resembling the tumor biology (protein markers) can improve the diagnosis, prediction and targeting of therapy. The introduction of proteomic methods into cancer research has brought strong expectations that the tools of proteomics would facilitate identification of new protein markers for breast cancer.
We have performed two-dimensional electrophoretic (2-DE) analysis of proteins from series of primary cultures of epithelial cells from breast cancer tissues as well as from several permanent breast cancer cell lines. In the first phase of our research we determined the phenotypes of the studied cells and identified characteristic protein spots. Mass spectrometry was employed for identification of proteins. Next, we have performed the 2-DE protein analysis of breast epithelial cells cultivated from tissues of different patients in various stages of breast cancer. We tried to find association among possible variations in the expression of proteins and clinical outcome of breast cancer patients, namely between the metastase-positive group of patients and the patients without metastases within three-year follow-up. Spot densities in 2-DE protein maps were subjected to statistical analyses (R/maanova package) and data-mining analysis (GUHA). Three protein spots were significantly altered between the metastatic and non-metastatic groups. The correlations were proven at the 0.05 significance level. Nucleophosmin was increased in the group with metastases. The levels of 2,3-trans-enoyl-CoA isomerase and glutathione peroxidase 1 were decreased.
Our data, methodological approach and specific features of breast cancer research will be discussed in the lecture.

O119

Detekce a identifikace *Coxiella burneti* a faktorů její virulence (Detection and identification of *Coxiella burnetii* biomarkers and/or factors of virulence)

Skultety L., Hernychova L., Flores-Ramirez G., Toman R.
Laboratory for Diagnosis and Prevention of Rickettsial and Chlamydial Infections, Institute of Virology, SAS, 845 05 Bratislava, Slovakia; Institute of Molecular Pathology and Proteome Centre for the Study of Intracellular Parasitism of Bacteria, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic
viruludo@savba.sk

Rapid and reliable detection and identification of pathogenic microorganisms is of great importance in numerous fields like clinical medicine, public health, food production, homeland defense, and environmental monitoring. For over a century, microbial identification techniques were dependent on conventional culture-based methods that characterize phenotypic differences and rely on biochemical and morphological tests. These methods were time-consuming and laborious, and the results were often ambiguous. In order to overcome these problems, 16S rRNA analysis has been used to define more accurately the phylogenetic affiliation of the given microorganism. However, being highly conserved, the 16S rRNA molecule cannot differentiate closely related microbial species. Therefore, we have applied alternative biomarker or protein profiling methods based on mass spectrometry in order to effectively differentiate closely related microbial species, and different isolates/strains of Coxiella burnetii.
For these purposes, a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based on microbial detection technology has been evaluated for a rapid detection and discrimination of bacterial strains/isolates. A one-step sample preparation protocol followed by MALDI TOF MS analysis is used to acquire a specific spectral profile with a wide range of protein biomarkers, including several higher-molecular-mass (10 to 20 kDa) protein species. In addition, a versatility of electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI MS/MS) for biomarker and virulence factor identification will be demonstrated.

O120
Využití analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-I v biochemii a proteomice

Vaněk O., Bezouška K.
Katedra biochemie, PřF UK Praha; Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. Praha
kenav3@seznam.cz

Analytická ultracentrifuga (AUC) je všestranným nástrojem pro studium proteinů a dalších makromolekul. Umožňuje monitorovat sedimentaci makromolekul v centrifugačním poli a tím jejich hydrodynamickou a termodynamickou charakterizaci v roztoku, bez interakce s matricí či povrchem.
V anal. ultracentrifuze je vzorek v reálném čase sledován pomocí speciálního optického systému využívajícího UV absorpci vzorku a/nebo interferenčním systémem využívajícím změnu indexu lomu světla vzorkem. To umožňuje operátorovi sledovat vývoj koncentrace vzorku vzhledem ke vzdálenosti od osy rotace jako výsledek aplikovaného centrifugačního pole. Takto jsou prováděny dva základní typy experimentů: sedimentační rychlost a sedimentační rovnováha. Výsledkem sedimentačně rychlostního experimentu je sedimentační koeficient dané makromolekuly, který přímo odpovídá její molekulové hmotnosti korelované jejími hydrodynamickými parametry. Lze rovněž usuzovat na přítomnost více molekul ve směsi, např. při tvorbě komplexu a charakterizovat jejich velikost a sílu interakce. V sedimentačně rovnovážném experimentu sledujeme finální stav termodynamické rovnováhy mezi odstředivou silou a difuzí působící na makromolekuly, tedy časově nezávislý koncentrační profil. Můžeme přímo určit molekulovou hmotnost částic, případně ze série různých ředění určit rovnovážnou konstantu tvorby komplexu a jeho stechiometrii.
ProteomeLab XL-I je v současnosti nejdokonalejší AUC systém s duální optikou citlivou i pro nízké koncentrace vzorků a v přednášce budou představeny jeho možnosti spolu s výsledky získanými od jeho instalace na Katedře biochemie PřF UK v Praze v prosinci 2007. Přístroj byl zakoupen s finanční podporou chemické sekce PřF UK a z prostředků GAČR (granty IAA5020403 a IAA500200708). Dále děkujeme společnosti Beckman Coulter, Immunotech a ČSBMB a Dr. Petru Manovi za jejich další podporu.

O121
Bakteriální identifikace pomocí proteomických metod

Hubálek M., Udržalová J., Netušilová K., Hernychová L., Marušová P., Dřevínek M.
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové; Ústřední vojenský zdravotní ústav, Praha;
Statní ústav pro jadernou, chemickou a biologickou ochranu, Kamenná
hubalek@pmfhk.cz

Moderní metody identifikace a typizace bakterií jsou stěžejně založeny na technikách molekulární biologie. Pokroky v proteomických technologiích, především v možnostech hmotnostní spektrometrie nabízejí alternativní řešení. Měření MALDI-TOF spekter celých bakterií nebo jejich extraktů umožňuje identifikaci bakteriálních druhů, poddruhů, popřípadě i izolátů. Rychlost je jednoznačně velkou výhodou takového postupu. Tyto metody již pomalu pronikají do klinické nebo forensní praxe. Metody tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií neposkytují výsledky v takové rychlosti, na druhou stranu umožňují měření s vysokou specificitou. Vzhledem k tomu, že nespoléhají na identifikaci necharakterizovaných markerů ve spektru, ale identifikaci specifických peptidů, spolehlivost výsledků je vysoká. Cílená detekce a identifikace peptidů, které mohou rozlišovat sledované bakteriální druhy či izoláty je možná například pomocí techniky zvané „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM). Taková identifikace bude demonstrována na vzorcích bakterií Francisella tularensis.

Postery

P202

Gene and protein expression responses in larvae of the fleshfly Sarcophaga bullata upon immune stimulation

Mášová A., Šindelka, R. Šanda M., Jiráček J.
ÚOCHB AV ČR v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ; Biotechnologický ústav AV ČR v.v.i., Vídeňska 1083, 142 20, Praha 4 140
masova@uochb.cas.cz

We chose larvae of fleshfly Sarcophaga bullata for mapping of peptidic and genomic immune response. We isolated, characterized and identified known and new promising molecules, peptides or proteins, which participate in immunity response against microbial infections. The hemolymph of the third-instar larvae of Sarcophaga bullata was used for isolation. The larvae were injected with bacterial suspension of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa or by entomological needle to induce antimicrobial response. The hemolymph was separated into crude fractions, which were subdivided by RP-HPLC or by gel chromatography. Isolated fractions were characterized by UV-VIS spectroscopy, amino-acid analysis, mass spectroscopy, and 1-D and 2-D SDS electrophoresis. Finally, we identified several peptides and proteins by tryptic digests or N-terminal sequencing. We found out significant antimicrobial activities against Escherichia coli, Staphylococus aureus and Pseudomonas aeruginosa in several fractions.
Using real-time PCR, we studied the time-dependent immune response of larvae of the fleshfly Sarcophaga bullata. We compared levels of mRNA expression of eight selected genes in induced and non-induced larvae. The third-instar larvae of Sarcophaga bullata were induced by injection with a bacterial suspension of Escherichia coli, Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa, or by simple injury with an entomological pin. Total RNA was isolated from the whole body, fat body and hemocytes. We found that there was a massive upregulation of genes encoding the fleshly peptide sapecin, and also the protein tranferrin in all organs studied. We also detected downregulation, or no change in the expression of the genes that encode prophenoloxidase 1 and 2, storage-binding protein, cathepsin L, sarcocystatin and 26/29 kDa protease.

P203

Investigation of the matrix influence on the quality of maldi-tof mass spectra of intact proteins and glycoproteins

Laštovičková M., Dyčka F., Bobálová J.
Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v. v. i. , 602 00 Brno, Veveří 97, Czech Republic
lastovickova@iach.cz

Since the choice of the matrix is of fundamental importance in analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF–MS), it was decided to test various matrices in order to find the most useful one for the different proteomic studies. Intact glycoproteins are complex molecules, because they contain both protein and glycan part, therefore they were selected as a standard samples for this study.
The set of simple matrices – 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP), 2,5-dihydroxyacetophenone (DHAP), α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid (SA) as well as binary matrices (DHB/CHCA, DHB/SA, DHB/THAP, DHB/DHAP, THAP/CHCA, THAP/SA) were tested. The application of binary matrices led to remarkable improvement of the mass spectra quality of standard glycoproteins. The combination of two matrices showed better crystal distribution over the sample preparation. Moreover, individual glycoforms of investigated glycoprotein were differentiated. Therefore these matrices were selected for the determination of proteins and glycoproteins from real matrices, extracted especially from plant materials (barley – Hordeum vulgare, Arabidopsis thaliana).
Acknowledgement: This work was supported from the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (Research Centre for the Study of Extract Compounds of Barley and Hop No. 1M0570), Grant Agency AS CR (IAA600040701) and Research Plan of Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic (AV0Z40310501).

P204
Use of divergent flow isoelectric focusing for sample preparation in study of beer-related proteins

Mazanec K., Bobáľová J., Šlais K.
Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v.v.i., Veveří 97, 611 42 Brno, Czech Republic
mazanec@iach.cz

A protein study by MS requires proper purification and separation of complex protein mixtures obtained from biological samples. The method of divergent flow isoelectric focusing (DF IEF) promises improvement in sample preparation in proteomic studies.
DF IEF was carried out on a separation channel with increasing width. The channel was cut out from the polyester non-woven web. DC voltage (800 V) was brought to two pares of electrodes situated on the sides channel. Amphoteric compounds like proteins drift through channel carried by flow (18 ml/h) in positions given by their isoelectric points. The pH gradient (3-10) and its stability during analysis were monitored with use of colored low-molecular mass pI markers. Separated fractions were collected in ten micro vials and further analyzed by MS.
The suggested method was used for separation and purification of crude protein extract from barley grain, malt and beer. MALDI-TOF mass spectra of separated intact proteins from collected fractions show better resolution and higher signal intensity. It simplifies the study of post-translational modifications and protein changes occurring during malting and brewing.
Results have shown the real potential of the suggested DF IEF lay-out as a high efficient preparative tool for separation and purification of complex protein mixtures for further analyses.
Acknowledgement:
This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (1M0570) and the Institute research plan AV0Z40310501.

P205
Characterization of proteins adsorbed to hemodialysis membrane in clinical setting

Tůma Z., Mareš J., Moravec J., Kroužecký A., Karvunidis T., Matějovič M.
Proteomic Laboratory of Charles University Medical School in Plzen; Dpt. of Internal Medicine,
Charles University Teaching Hospital in Plzen
zdenek.tuma@lfp.cuni.cz

Hemodialysis is the most common method used to treat chronic kidney failure. Patient's blood is pumped into a cartridge (dialyzer) containing two fluid compartments configured as bundles of hollow fiber capillary tubes. The purpose of hemodialysis is to reach removal (clearance) of catabolites and uremic toxins, to establish acid-base balance and ion equilibrium. During hemodialysis, blood is exposed to artificial material and various interactions of plasmatic proteins with the dialyser may occurr. These proteins may subsequently activate blood coagulation, complement, fibrinolytic system and adhesion of leukocytes. In this work, elution of proteins adsorbed to hemodialysis membrane was optimized for proteomic analysis and identification of selected proteins was performed.
After dialysis, dialyzers (Fresenius F6 HPS) were flushed with saline to remove blood from the system. For protein elution, three solutions were tested (10% SDS; 8M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS; 40% acetic acid). Protein solutions were concentrated in vacuum evaporator and dialyzed. Two-dimensional electrophoresis (2DE) was performed with 7 cm IPG strips with pH range 3-10 and 13% polyacrylamide gels. Selected proteins were excised from gels, digested with trypsin and obtained peptide fragments were analyzed on Applied Biosystems 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer. Proteins were identified by comparing MS and MSMS data with Swissprot database.
Best quality of 2D electrophoretic gels was achieved when 40% acetic acid was used for elution. Dialyzers from five patients and three procedures from each patient were processed.
Total protein amount and pattern eluted from each dialyzer was determined and compared with protein content of the flush. 2DE was performed in duplicates on all samples and gel images were analyzed using PDQuest software. 134 protein spots were selected for identification. 43 unique proteins were identified on 102 spots.

P206

Proteomic analysis of the cytoskeleton assembly in chronic myelogenous leukemia cells: effect of tyrosine-kinase inhibitor imatinib mesylate

Grebeňová D., Pluskalová M., Kuželová K., Halada P., Pešlová K., Hrkal Z.
Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Institute of Microbiology AS CR, Prague
greb@uhkt.cz

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disease that is characterized by the presence of fusion oncogene bcr-abl. The constitutive kinase activity of BCR-ABL leads to the activation of several signaling pathways including defective adhesion to the bone marrow stroma and extracellular matrix. Introduction of the BCR-ABL kinase inhibitor imatinib mesylate (Novartis Pharma AG) into the clinic led to the efficient therapy of CML patients. Nevertheless few reports concern the impact of imatinib treatment on the cytoskeleton assembly and altered cell adhesion to the extracellular matrix.
By means of two-dimensional electrophoresis we produced the protein maps of CML-derived cells JURL-MK1. Seventy protein spots were identified by MS/MS mass spectrometry. Following imatinib treatment we observed changes in the patterns of several proteins involved in the regulation of cytoskeleton dynamics, namely tropomyosins, 14-3-3 family proteins and the actin depolymerizing factor, cofilin.
Assembly of cytoplasmic actin into microfilaments is governed by cofilin-actin and tropomyosin-actin interactions. Cofilin acts as the actin depolymerizing factor. Its activity is prevented by phosphorylation and further by binding 14-3-3 zeta, on the phosphorylated site. As a result of imatinib treatment 14-3-3 zeta was suppressed and lost its phospho-cofilin protective function. Cofilin was dephosphorylated and thereby could be activated. Accordingly we reported depolymerization and severing of F-actin and cytoskeleton disruption using FITC-phalloidin staining. Suppression of tropomyosin level due to imatinib mesylate treatment may contribute to the cytoskeleton disassembly as the tropomyosin fundamental function to mechanically stabilize actin microfilaments is attenuated. These events result in the relaxation of cytoskeleton structure and suppression of cell binding to immobilized fibronectin.
Supported by grant NR/9243-3 of the Ministry of Health, Czech Republic

P207

Immobilization of trypsin conjugates on paramagnetic nanoparticles for protein digestion

Zajoncová L., Pečová M., Zbořil R., Šebela M.
Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci;
Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
ludmila.zajoncova@upol.cz

The ability of trypsin to hydrolyze polypeptide substrates at the specific cleavage sites makes it a very important tool for protein analysis in proteomic research. But this enzyme shows only marginal thermostability at 37 °C and undergoes rapid autolysis under basic pH. Trypsin autolysis in the reaction mixture generates autolytic peptides that may obscure sample analysis. Conjugating bovine trypsin with maltotriose and raffinose increased its thermostability and suppressed autolysis without affecting its cleavage specificity. In this work, trypsin and its conjugates with the oligosaccharides were immobilized on magnetic carriers. At the beginning, magnetic nanoparticles were coated with chitosan and then the enzyme or its conjugates were bound to their surface using glutaraldehyde as a coupling agent. The size and structure of the magnetic nanoparticles with immobilized trypsin were characterized by transmission elektron microscopy and the saturation magnetization was also determined. At the same time, free and immobilized trypsin conjugates were characterized by determining activity, Michaelis constant (Km) for the artificial trypsin substrate BAPNA, thermostability, operational and functional stability and storage stability. The performance of the magnetic biomaterial was demonstrated by in-solution digestion of standard proteins: bovine serum albumin, ovalbumin horseradish peroxidase and lysozyme. Compared to common protocols, the digestion time was reduced to one hour. The immobilized enzyme could be separated easily from protein digests prior to MALDI-TOF MS and the interference of trypsin autolysis was eliminated.
This work was supported by the grant MSM 6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic.

P208
Povrchové mapování proteinů v oleosomech A.thaliana

Vermachová M., Šantrůček J., Kodíček M.
Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Martina.Vermachova@seznam.cz

Oleosomy (angl. oil-bodies) jsou lipoproteinové částice, v nichž jsou uloženy zásobní lipidy v semenech rostlin. Skládají se převážně z triacylglycerolů, které obklopuje jednovrstevná fosfolipidová „membrána“. V ní jsou umístěny četné proteiny, které oleosomy stabilizují a pravděpodobně hrají důležitou roli při jejich vzniku a degradaci. Informace o jejich prostorovém uspořádání a mechanismu působení jsou velmi kusé a vycházejí především z teoretických výpočtů. Cílem této práce je identifikovat ty části proteinů, které jsou v kontaktu s vodným prostředím. Zvolená metoda povrchového mapování je založena na selektivních chemických modifikacích některých aminokyselin a jejich identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.
Oleosomy byly izolovány ze semen Arabidopsis thaliana a modifikovány činidly specifickými pro arginin, lysin, tyrosin, tryptofan, cystein a společně pro aspartát a glutamát. Poté byly proteiny rozděleny SDS-PAGE a štěpeny přímo v gelu trypsinem nebo chymotrypsinem. Hmotnostní posuny, charakteristické pro jednotlivé modifikace, byly pak hledány v hmotnostním spektru směsi peptidů metodou MALDI-TOF.
Podařilo se spolehlivě identifikovat modifikace některých postranních řetězců argininu, lysinu a tyrosinu. Místa modifikací kyselých zbytků bylo obtížné navzájem jednoznačně odlišit. Tryptofany se nemodifikovaly, což odpovídá jejich předpokládané lokalizaci uvnitř oleosomu. Z reaktivity zbytků lze vyvozovat závěry o jejich lokalizaci a případných interakcích mezi částmi studovaného systému. Pomocí modifikace cysteinů jsme se pokusili vyšetřit výskyt disulfidových můstků.
Provedené experimenty potvrdily základní, doposud především teoreticky podložené představy o uspořádání proteinů v oleosomech a umožnily navrhnout lokalizaci hydrofilních domén na rozhraní lipidy/fosfolipidy/cytosol nebo volně v cytosolu. Spojení povrchového mapování s modelováním proteinů otevírá cestu k reálnějšímu pohledu na terciární strukturu některých obtížně studovatelných proteinů.

P209
Proteomic analysis of wheat prolamins in the presence of related proteins of rice and maize

Šalplachta J., Laštovičková M.
Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 97, 602 00 Brno
salplachta@iach.cz

The ability of proteomics (based on mass spectrometry) to identify wheat prolamins (gliadins) in the presence of large amounts of related proteins from rice and maize has been investigated in this study. Gliadins are known as an environmental factor triggering celiac disease – a chronic disorder of the small intestine occurring in genetically susceptible individuals and it is induced by ingestion of prolamins of wheat, barley, rye, and oats. With respect to celiac disease rice and maize prolamins are non-toxic and, therefore, the rice and maize form basis of gluten-free diet – until now the only effective treatment of celiac disease. However, foods based on the non-toxic cereals, such as rice and maize, are often contaminated with important amount of wheat.
The most common method for determination of gliadins is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Although, the immunochemical tests are specific and sensitive, in some cases this technique, based on the use of antibodies, fail (sometimes it provides inconsistent results). For this reason, proteomic-based approach was performed in order to unambiguously identify the gliadins in cereal protein mixtures.
Acknowledgement
This work was supported by the National Agency for Agricultural Research of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Reseach project No. 1B53002) and by Institutional Research Plan AV0Z 40310501 of Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic.

P210
Comparison of expression of Glutathione S-transferases in cancer cell lines using affinity chromatography and 2-DE

Mládková J., Šanda M., Selicharová I.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i.
mladkova.jana@seznam.cz

Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of Phase II detoxification enzymes. They catalyse the conjugation of glutathione (GSH) to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds including chemical carcinogens. The soluble GSH conjugates are susceptible to detoxification and elimination. The GSTs play an important role in anti-cancer defence. We have studied distribution and the level of expression of GSTs in cancer cell lines. GSTs were purified from three cell lines (EM-G3, MCF7, HCC) derived from breast cancer cells and one cell line (HeG2) derived from liver cancer cells using affinity chromatography on GSH Sepharose 4B. Quantity and representation of proteins interacting with GSH was studied by two-dimensional gel electrophoresis. The proteins were identified by mass spectrometry.

P211
Využití elektroforeticky zprostředkované mikroanalýzy v proteomice pro on-line tryptické štěpení proteinů

Zeisbergerová M., Klimíčková A., Glatz Z.
Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova universita, Brno
glatz@chemi.muni.cz

Proteomika je rychle se rozvíjející oblast biochemického výzkumu, jejíž hlavní náplní je charakterizace komplexních směsi proteinů extrahovaných z buněk či tkání. Dominantní metodou je zde dvojrozměrná elektroforéza 2D-PAGE. Přestože je schopna rozseparovat tisíce proteinů během jediné analýzy, má vážná omezení – jde o metodu pracnou a časově náročnou, nelze opomenout i limitovanou citlivost a dynamický rozsah. Proto jsou hledány jiné metody vyznačující se vysokou separační účinnosti, a především možností přímé kombinace s tryptickým štěpením a detekcí pomocí MS. Jako jedna z variant se také nabízí kapilární elektroforéza (CE), především pak její modifikace – elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza (EMMA). Ta se vyznačuje plnou automatizací kombinovanou s velmi malou spotřebou vzorku, což je dáno tím, že EMMA využívá kapiláru nejenom jako separační medium, ale také jako reakční prostor. Cílem této práce bylo využít metodu EMMA pro on-line tryptické štěpení proteinů pro proteomický výzkum s předpokládaným spojením s detekcí pomocí MS.
Vzhledem ke skutečnosti že pH optimum trypsinové reakce se liší od optimálního pH používaného v CE pro separaci peptidů, byla zde použita kombinace metody EMMA s technikou částečného plnění kapiláry. V tomto uspořádání je ta část kapiláry kde probíhá tryptické štěpení naplněna pufrem optimálním pro tuto reakci (Tris-HCl pufr pH 8.5), kdežto zbytek kapiláry základním elektrolytem optimálním pro separaci peptidů (0.1 M fosfátový pufr pH 2.5). Jelikož se proteiny liší svými pI a tím i efektivní mobilitou, bylo použito sendvičové dávkování, při kterém je vzorek proteinu nadávkován mezi dvě zóny trypsinu, což zaručuje jejich promíchání a tím i digesci. Analýza jednoho proteinu včetně digesce a separace vzniklých peptidů tak trvá jednu hodinu, což je značné zkrácení oproti klasické digesci v roztoku.

Tato práce byla sponzorována grantem č. 203/06/0047 GAČR a výzkumným záměrem MSM0021622413 a centrem základního výzkumu LC06023.

Přednášky

O122

Biological recognition elements for bioanalytical systems

Fránek M.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 62100 Brno
franek@vri.cz

Recognition is one of the fundamental processes in living systems. Bioanalytical techniques(immunoassays, biosensors, immunoaffinity chromatography and related methodologies) combine these natural recognition capabilities with modern detection systems to make measurements of both high-and low molecular analytes faster and more accurate. Avalilability and high quality of biological recognition elements (BRE) is the first precondition for successful development of any bioanalytical device. This presentation will be focused to the development and production of selected BRE that are well-suited for immunoanalytical and particularly biosensor developments and applications.
Antibodies are classical receptors used broadly in clinical, environmental and food analysis and diagnostics including the life sciences area. The production of high quality antibodies remains topical task for today@s generation of immunochemists. The attemption will particularly be devoted to antigen design for proteins covering availability of protein antigens, preferred peptide sequences for immunogen preparation, conformational and linear epitopes, homology considerations, protein prediction programs, probability of antibody production success, hapten design etc. Surface phage display of the antibodies allows affinity selection by the antigen in vitro-an analogue of selection by antigen in natural immunity. Affinity selection of antibodies is accomplished by exposing the phage library to immobilized antigen entities (binding clones are captured and non-binding clones are washed away). Advantages and disadvantages of conventional immunisation, hybridoma technology and recombinant (phage) approaches will be compared.
Aptamers are nucleic acid ligands that are designed through an in vitro selection process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Due to the high diversity of structural species of all possible nucleotide sequences, aptamers were selected for a wide array of targets, including proteins, carbohydrates, lipids or small molecules. Aptamers offer somel advantages over antibodies as they can be completely engineered in vitro, produced and labeled by chemical synthesis, and possess good storage properties. In addition, aptamers receptors, due to their production by chemical synthesis, have a several advantages that make them very promising in analytical applications. Recently, aptamers have been used in analytical applications as immobilized ligands or in homogeneous assays. A promising application is the exploitation of aptamers as BRE in biosensors.
Synthetic receptors based on helix-loop-helix polypeptide scaffolds are a new class of BRE for protein recognition. In this type of the protein binders, polypeptides are covalently linked to a small organic structure to form polypeptide conjugates that bind proteins with high specificity and binding affinity. The chemical concept to protein recognition offers well-defined molecular structures that can be easily managed, stored and site-specificaly functionalised. Sensitivity, selectivity and stability of this BRE in conventional and advanced assay formats will also be demonstrated.

O123

Aplikace mikrodialýzy pro měření cytokinů v tukové tkáni u obesních jedinců

Vítková M., Polák J., Klimčáková E., Kováčiková M., Kováčová Z., Vrzalová J., Rossmeislová L., Hněvkovská Z., Štich V.
Ústav tělovýchovného lékařství, 3. lékařská fakulta UK, Praha; Oddělení Imunoanalýzy, Lékařská fakulta UK v Plzni
mysak.bob@centrum.cz

Úvod: Mikrodialýza je metodou, která nám umožňuje stanovení intersticiální hladiny látek u člověka. Její velkou výhodou je možnost sledování změn koncentrace lokálně ve tkáni za různých intervenčních podmínek, bez ovlivnění celého organismu. V naší práci jsme se věnovali zavedení metodiky pro sledování cytokinů v tukové tkáni a následně jsme ji použili ve dvou dynamických protokolech: vliv hyperinsulinemie a vliv krátkodobé fyzické zátěže na produkci cytokinů v tukové tkáni.
Metody: Pro všechny experimenty byly použity komerční sondy CMA s „cut-off“ 100kDa. Prostupnost cytokinů přes sondu byla stanovena pomocí metody „zero-flow“. Efekt insulinu byl sledován u 7 žen (BMI 36,7±5,6 kg.m-2) u nichž byl proveden hyperinsulinový-euglykemický klemp. Dialyzát byl sbírán v basálním stavu a během 3h klempu. U stejných subjektů byl proveden také kontrolní experiment bez intervence. Vliv zátěže byl studován u 8 obesních mužů (BMI 31,3±2,3 kg.m-2), kteří vykonali 45 minut cvičení. Ve vzorcích dialyzátu byly stanovovány proteiny: IL-6, IL-1b, IL 8, TNFa, MCP 1 a PAI-1 s využitím ELISA metod a multiplexové imunoanalýzy na přístroji Luminex.
Výsledky: Pomocí in vitro a in vivo experimentů jsme zjistili prostupnost cytokinů přes sondu, která se pohybuje mezi 15 – 40%. Hladiny cytokinů, které jsme stanovili v tukové tkáni jsou 10x -1000x vyšší nežli hodnoty plasmatické. Vlivem hyperinsulinemie došlo ke zvýšení produkce MCP-1, IL-8 a IL-6 v tukové tkáni a zvýšení MCP-1 v plasmě. U ostatních sledovaných proteinů nedošlo ke změně koncentrace. Vlivem fyzické zátěže došlo k signifikantnímu zvýšení koncentrace IL-6 v dialyzátu až na trojnásobnou hodnotu ($p<0,001$).
Závěr: Mikrodialýza ve spojení s multiplexovou imunoanalýzou je velmi účinným prostředkem pro studium metabolismu tukové tkáně in vivo. V našich studiích jsme prokázali, že dochází k regulaci některých cytokinů vysokou hladinou insulinu a také v reakci na fyzickou zátěž.
Práce byla podporována grantem GACR 303/07/0840.

O124
Bioanalytical analysis and thermodynamic evaluation of G-quadruplex DNA structures

Viglasky V., Bauer L., Tlučková K., Walko M.
PF-UPJŠ,ÚCHV, Katedra biochémie, Moyzesova 11, 04154 Košice.
viktor.viglasky@upjs.sk

G-rich regions appear in several locations in the human genome, including at the ends of linear chromomes, the immunoglobin switch region, centromeres, fragile X syndrome repeats, and promoters of some genes. The sequences repeated in tandem, with three or four adjacent guanines, have been known to form polymorphic quadruplexes containing G-quartets stabilized by cyclic Hoogsteen hydrogen bondings. Quadruplex structures are highly stable DNA or RNA structures formed on G-rich sequences. Naturally occurring G-rich DNA sequences that are able to form parallel/antiparallel G-quadruplex structures appear as potential targets for anti-cancer chemotherapy, and therefore play an important role in cellular processes, such as cell aging, death and carcinogenesis. The telomeric regions of DNA and nuclease hypersensitive elements of human c-myc, VEGF and PDGF-A promoters represent a very appealing target for many drugs and may interfere with normal DNA function. For example platinum complexes bind covalently to nucleobases and especially to the N7 atom of guanines and the four guanines of a G-quartet have their N7 atoms involved in hydrogen bonding. Therefore, within a G-quadruplex structure, only the guanines out of the stack of G-quartets should react with electrophilic species such as platinum (II) complexes. Platinum complexes significantly moderate the formation of G-quadruplexes. Results obtained by CD spectroscopy, PCR and Temperature gradient-gel electrophoresis (TGGE) clearly demonstrate that DNA platination significantly affect G-quadruplex folding for telomeric sequences; the abundance of unfolded DNAs to G-quadruples is proportional to platinum concentration.

O125
Imunosensory pro detekci patogenních mikroorganismů

Skládal P.
Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno
skladal@chemi.muni.cz

Detekce patogenních mikroorganismů má význam v řadě oblastí, mimo jiné i ve vojenství a při ochraně proti potenciálním bioteroristickým útokům. Budou uvedeny výsledky testování a porovnání různých typů biosensorů vhodných pro rychlou detekci mikroorganismů použitím specifických protilátek. Kombinací protilátky a vhodného převodníku vzniká imunosensor. Detekci je možné provádět v laboratoři pomocí optických převodníků na bázi povrchové plazmonové rezonance (komerční systémy Biacore a Spreeta) a rezonančního zrcadla (IAsys), nebo pomocí piezoelektrického krystalu (chemické mikrovážky vlastní konstrukce). Přímé sledování vznikajícího imunokomplexu probíhá v reálném čase. Pro dosažení vyšší citlivosti detekce je možné využít enzymové značky v kombinaci se sítotiskovými elektrochemickými sensory a nepřímé měření. Testování vyvíjených biosensorových detektorů bylo prováděno s modelovými mikroorganismy Francisella tularensis a Escherichia coli. Byl zkonstruován přenosný amerometrický imunosensor ImmunoSmart zahrnující i průtočný systém pro dávkování vzorků a bioregencií, využitelný pro automatické monitorování. Systém může být použit pro vodné vzorky, po spojení s cyklonem i pro vzorkování bioaerosolů ze vzduchu. Testované prototypy umožňují sekvenční měření s 15 min intervalem, dosahovaná mez detekce je pod 1000 CFU/ml. Budou prezentovány zkušenosti z testování elektrochemického imunosensoru v aerosolové komoře i v polních podmínkách.

O126

Metabolite profiling from the viewpoint of stochastic systems theory: the tool for realistic data evaluation

Urban. J., Jan Vaněk J., Soukup J., Štys D.
Institute of Physical Biology, University of South Bohemia, Academic and University Center, Zámek 136, 373 33 Nové Hrady, Czech Republic; Department of Cybernetics, West Bohemia University, Pilsen, 301 00 Czech Republic; Code Farms Inc., Box 344, 7214 Jock Trail, Richmond, Ontario, Canada K0A 2Z0; Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Science of the Czech Republic, Academic and University Center, Zámek 136, 373 33 Nové Hrady, Czech Republic
stys@jcu.cz

In many situations, system biology depends on metabolite profiling which, due to its experimental nature, usually does not provide the generality and uniformity of data needed for pathway models. This paper analyzes LC-MS based the metabolite profiling experiment in general, and describes it in a manner which is mathematically correct and instrument independent. This has two advantages: (a) Signal-probability pairs for each signal allow to compare data sets and help in stochastic modeling; (b) comparing to the usual threshold or blank experiment subtraction, the interpretation of data entirely automatic.

O127

The utility of coupling ion mobility and oaTOF mass spectrometry

Kennedy M., Wildgoose J., McKena T., Hughes Ch., Giles K., Pringel S., Campuzano I., Langbride J., Bateman H. R.
Waters MS Technology Centre, Manchester UK

Traditional ion mobility spectrometers are based around separating a packet of ions by dragging them through a background gas using a uniform DC electric field. The physical principles behind the DC-only drift tubes are well characterised and mobility values obtained can be used to derive ion-neutral interaction cross sections for comparison with theory. Other work has focussed on the capability of ion mobility in separation of more complex mixtures or where isobaric interferences exist. Typically, DC-only systems suffer from low sensitivity due to duty cycle and ion diffusion effects.
Recently we have combined a travelling wave ion mobility (TWIMS) device within a quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer, enabling ion mobility separations to be combined with mass spectrometry at high sensitivity. The TWIMS is a stacked-ring ion guide, operated at elevated pressure, with opposite phases of an rf voltage applied to adjacent plates providing radial ion confinement. A continual sequence of dc pulses is superimposed on the confining rf to provide waves which propel ions through the gas.
This presentation will introduce and describe the requirements and methodology of coupling the travelling wave-based ion mobility separator (TWIMS) to an orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer, as well as its utility to simplifying complex data for several applications.
LC/MS in clinical and toxicological analysis: (i) A Complete General Unknown Screening Workflow for Analysis of Drugs and Toxic Compounds (ii) Routine Quantitative analyses of target Drugs or Endogenous Clinical markers.
Clinical and forensic laboratories commonly use automated immunoassays, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high pressure liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) techniques to perform general unknown screening (GUS) analysis and/or routine quantitation of target drugs (TDM) and endogenous markers.
(i) Neither immunoassays nor GC-MS are sufficient to identify all the drugs and toxic compounds that are potentially present in a sample. Moreover immunoassays can show false positive results and GC-MS require tedious sample derivatization and in addition to this is not convenient for polar compounds. Complimentary implementation of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for GUS provides specific and sensitive analysis of drugs and toxic substances. The benefits of the LC-MS GUS methodology include a simple sample preparation procedure, ease of adding new compounds to the screening method and fewer limitations based on compound volatility and thermal stability. In addition, a customized software program (ToxID™1.0, Thermo Scientific) is able to automatically generate both short and long reports, avoiding the need for manual analysis of each sample chromatogram. The contribution describes the use of LC/MS equipped with an ESI source, for identification of unknown compounds in human urine.
(ii) TDM (immunosuppressants, anti-depressants, anti-HIV) and the monitoring of endogenous clinical markers (testosterone, cortisol, vitamin D and etc.) are important to support clinical decisions. Traditionally used immunoassays are sometimes not enough specific, are not always available and expensive. LC/MS/MS platform is ideal for such type of analysis where very sensitive, selective and robust quantitation of target compounds is strongly required. Moreover high throughput, high level of automatization, easy to operate and low cost per analysis represent an important issue. The contribution shows examples of complete and validated LC/MS/MS methods including on-line sample preparation using turboflow technology, column switching and LC multiplexing for selected compounds.

O128

LC/MS in clinical and toxicological analysis: (i) A Complete General Unknown Screening Workflow for Analysis of Drugs and Toxic Compounds (ii) Routine Quantitative analyses of target Drugs or Endogenous Clinical markers

Duretz B.
Thermo Fisher Scientific

Clinical and forensic laboratories commonly use automated immunoassays, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high pressure liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) techniques to perform general unknown screening (GUS) analysis and/or routine quantitation of target drugs (TDM) and endogenous markers.
(i) Neither immunoassays nor GC-MS are sufficient to identify all the drugs and toxic compounds that are potentially present in a sample. Moreover immunoassays can show false positive results and GC-MS require tedious sample derivatization and in addition to this is not convenient for polar compounds. Complimentary implementation of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for GUS provides specific and sensitive analysis of drugs and toxic substances. The benefits of the LC-MS GUS methodology include a simple sample preparation procedure, ease of adding new compounds to the screening method and fewer limitations based on compound volatility and thermal stability. In addition, a customized software program (ToxID™1.0, Thermo Scientific) is able to automatically generate both short and long reports, avoiding the need for manual analysis of each sample chromatogram. The contribution describes the use of LC/MS equipped with an ESI source, for identification of unknown compounds in human urine.
(ii) TDM (immunosuppressants, anti-depressants, anti-HIV) and the monitoring of endogenous clinical markers (testosterone, cortisol, vitamin D and etc.) are important to support clinical decisions. Traditionally used immunoassays are sometimes not enough specific, are not always available and expensive. LC/MS/MS platform is ideal for such type of analysis where very sensitive, selective and robust quantitation of target compounds is strongly required. Moreover high throughput, high level of automatization, easy to operate and low cost per analysis represent an important issue. The contribution shows examples of complete and validated LC/MS/MS methods including on-line sample preparation using turboflow technology, column switching and LC multiplexing for selected compounds.

Postery

P212
Radiometric determination of the iodothyronine deiodinases enzyme activities

Pavelka S.
Department of Radiometry, Institute of Physiology, ASCR, Prague 4 and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno
pav@chemi.muni.cz

The aim of the present study was to establish valid assay conditions for the radiometric determination of the iodothyronine deiodinases (IDs) enzyme activities of the types 1, 2 and 3 (D1, D2 and D3, respectively). Monodeiodinations catalyzed by these enzymes play crucial roles in the metabolism of thyroid hormones. D2 is a selenoenzyme responsible in the brain cells for selective 5' (outer ring)-deiodination of prohormone thyroxine (T4), converting it to biologically more active 3,5,3'-triiodothyronine (T3). On the contrary, 5 (inner ring)-deiodination, carried out by selenoenzyme D3, inactivates both T4 and T3.
Our newly developed radiometric assays for IDs were based on the use of 125I-labeled iodothyronines as substrates, optimized TLC separation of radioactive products from the unconsumed substrates, film-less autoradiography of radiochromatograms using storage phosphor screens, and quantification of the separated compounds with a BAS-5000 (Fujifilm Co.) laser scanner. This methodology enabled us to determine IDs enzyme activities as low as 10-18 katals. On the other hand, the same system, used under proper concentration conditions, allowed a measurement of IDs activities as high as 10-12 katals.
We have used these enzyme assays for the quantification of IDs activities induced in cultured astroglial cells by several purinergic agonists and agents controlling the intracellular Ca2+ concentration. The cells grown in a chemically defined medium devoid of hormones and growth factors were incubated for short time with different concentrations of these effectors. The assays proved to be very sensitive and rapid and, at the same time, reliable and robust.
Acknowledgements: This work was supported by the Academy of Sciences of the CR (research project AV0Z50110509), by the Ministry of Education of the CR (research project MSM0021622413) and by the Grant Agency of the ASCR (Grant No. KJB401630701).

P213
Immunochromatographic tests for the detection of different types of analytes

Blažková M., Šmídová Z., Fukal L., Wichers J. H., Rauch P., van Amerongen A.
Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze;
martina.blazkova@vscht.cz

Lateral flow tests based on the principles of immunochromatography are used for the detection of a wide range of target analytes. The benefits of these tests include: user-friendly format, short time to get test result, long-term stability, and relatively low price. These features make strip tests ideal for applications such as home testing and testing of various environmental and food analytes.
Many variations of immunochromatographic tests are possible, but they all have in common the formation of a complex between a detector reagent bound to coloured particles that co-migrate in the sample stream and a capture reagent that is bound to the membrane at the position of the test line.
The two predominant approaches to the tests are the non-competitive and competitive reaction schemes. The aim of this paper is to present examples of both of them. The non-competitive (direct) format for the detection of Listeria and the competitive format for analysis of pesticides will be demonstrated.
A new promising application is the detection of genetic material. The interest in using a simple format for detecting various genetic markers, e. g. DNA or RNA specific for infectious disease pathogens is increasing. The lateral flow method for the detection of amplified nucleic acid probes specific for Listeria will be presented.
This work was supported by the Grant of Ministery of Education MSM 6046137305 and National Research Programme II 2B06048.

P214
The development of an immunochromatographic method for the determination of pesticide carbaryl

Holubová B.
Department of Biochemistry and Microbiology, ICT, 3 Technicka street, 16628 Prague 6, CZ
Barbora.Holubova@vscht.cz

Special attention in regulation of contaminants in human environment is paid to pesticides. N-methylcarbamate pesticide carbaryl belongs to an important class of pesticides noted for their relatively short persistence in the environment. But since they are inhibitors of acetylcholinesterase, they are regarded as toxic for the environment and for humans (especially for children). As shown by human exposure studies, dietary ingestion is in most cases the pathway to become exposed to these pollutants.
With an increasing importance of immunochemical methods for pesticide screening and quantification, it is also possible to quantify N-methylcarbamates at sub-ppb levels in food and environmental samples by these techniques. Quantitative immuno-detection of carbamates is mainly based on microtitre plate technology using competition assays (ELISA). ELISA method, however, generally requires hours and skilled personnel, and the application is normally restricted to well-equipped laboratories. On the other hand, the upcoming commercially available on-site immunochromatographic tests allow a rapid and at least semi-quantitative determination of analytes and could be incorporated into the food inspection, surveillance and monitoring programmes of regulatory agencies.
The aim of the present work was the construction of a simple, portable and rapid competitive immunochromatographic method LFIA (lateral flow immunoassay) on a flat porous membrane for on-site testing of carbaryl. For construction of competitive test the specific monoclonal antibody and the coresponding hapten-ovalbumin conjugate were used. In the running buffer 0.1 M borate buffer with addition of BSA and Tween it was possible to detect carbaryl in orders of ones of u/kg. These results show that the developed method will be available for controlling of maximum residue limits in environmental samples and food products, especially in baby food (the maximum residue limit is 10 ug/kg).
Acknowledgement: This work was supported by the Grant Agency of Czech Republic, No. 525/07/P273 and no. 525/07/0618 and by Grant of Ministery of Education MSM 6046137305.

P215
Comparison of immunochemical methods for detection of thiabendazole

Šmídová Z.
Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 3, 166 28 Prague
zuzana.smidova@vscht.cz

Immunochemical methods, based on reaction of antigen with specific antibody, represent an interesting approach for sensitive and specific detection of pesticides with many advantages compared to the conventional methods, e.g. rapidity and convenient price. In this work, two methods for detection of the pesticide thiabendazole were compared: the ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay). Several parameters were examined, such as sensitivity, detection limit and time required to get the result.
Thiabendazole (TBZ), a member of the benzimidazole fungicides, is used to control diseases (e.g. rot, mold) in fruits and vegetables and also for the post-harvest treatment of fruits. Residues of TBZ can be often found in citrus fruits, bananas, apples and pears. The maximum residue limit (MRL) of TBZ varies depending on the particular crop and country, in the 0.05-15 mg/kg range. However, the MRL for baby food is even more strict, 10 μg/kg.
For the detection of thiabendazole, both methods are very suitable because of their high sensitivity and specificity for TBZ. With the ELISA, the detection limit was 0.1 ng/mL and with the LFIA 1 μg/mL (in buffer solution). As for the ELISA, it is used when quantitative results are required whereas the LFIA is used for semi-quantitative analysis. The last but not the least is the advantage that the LFIA does not require special laboratory equipment and technical skills of personnel. What`s more, the LFIA enables to analyze the samples onsite and to get results within several minutes. This can be very useful in food monitoring and control. In the future experiments, both methods will be optimized for detection of thiabendazole in food samples – fruit juices and baby food.
This work was supported by the Czech Grant Agency No. 525/07/0618 and by Ministry of Education of the Czech Republic, No. MSM 6046137305.

P216
Profilové metódy pri získavaní informácií o patologických stavoch biologických systémov

Birková A., Dubayová K., Tichá M., Kušnír J.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UPJŠ Košice
birkova@upjs.sk

Biologický materiál je možné hodnotiť ako jeden celok pomocou profilových metód. Tie popisujú biologický materiál na základe vytypovaných spoločných kritérií látok obsiahnutých v takto komplexných zmesiach – napríklad na základe fluorescenčných parametrov. Profilové metódy vyžadujú len minimálnu úpravu vzorky pred analýzou a umožňujú analytický pohľad na viacero analytov naraz. Tým podávajú rýchlejšiu a komplexnejšiu informáciu o biologických zmesiach ako klasické analytické metódy, ktoré sú selektívne a náročné na predúpravu vzorky. Moč je ľahko dostupný biologický materiál, ktorý poskytuje obrovské množstvo informácií o aktuálnom stave organizmu. Na súčasné meranie skupín látok s podobnými vlastnosťami v moči možno použiť rôzne metodiky. Ako spoločné kritérium na analýzu biologickej zmesi bola využitá schopnosť niektorých jej súčastí prirodzene fluoreskovať. Profil minimálne upraveného moču získaný spektrálnym fluorimetrom poskytuje úplne inú kvalitu informácie ako profil získaný meraním HPLC s fluorescenčnou detekciou. Obe techniky sa navzájom výhodne dopĺňajú a umožňujú lepšie charakterizovať vytypované vlastnosti biologického systému.

Táto práca je podporovaná grantom VEGA 1/336406.

P217
Multifluorescenčné modelové zmesi a ich využitie na analýzu niektorých biologických materiálov

Tichá M., Birková A., Dubayová K., Kušnír J.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UPJŠ Košice
ticham@medic.upjs.sk

Fluorescencia v ostatných dvadsiatich rokoch patrí medzi významné metódy štúdia živej hmoty. Ide o neinvazívny spôsob využívajúci interakcie svetla s hmotou. Meranie prirodzenej fluorescencie (autofluorescencie) a sofistikované spracovanie nameraných dát je bohatým zdrojom informácií o biologických systémoch – tkanivách, bunkách, telových tekutinách. Fluorescenčné metódy založené na snímaní a matematickom spracovaní signálu natívnych fluorofórov prítomných v biologických tekutinách ponúkajú perspektívny a doteraz naplno nevyužitý potenciál pre detailné štúdium takých zmesí.
Analýza multikomponentného biologického materiálu je veľmi obtiažna, preto je potrebné vymodelovať taký systém, ktorý by charakterizoval kvalitu a kvantitu mnohozložkového systému fluorofórov. Do modelovej zmesi boli vybrané tri významné prirodzené fluoroféry – indoxylsulfát (močový indikán), kyselina 5-hydroxyindol-3-octová a kyselina vanilmandľová. Ich zvýšená produkcia a následné vylučovanie močom sa prejavuje pri viacerých patologických stavoch. Ich vzájomné vzťahy sme monitorovali pomocou excitačno-emisných spektier a 3D synchrónnych spektier. Grafickú definíciu zloženia umelo pripravených zmesí sme doplnili o HPLC, ktorá zlepšuje najmä kvantitatívnu stránku komplexnej a komparatívnej analýzy.

Táto práca bola súčasťou grantu VEGA 1/3364/06.

P218

Detekcia jednonukleotidovej mutácie pomocou high-resolution melting analýzy s využitím farbičky EvaGreen

Radvánský J., Minárik G., Kádaši Ľ.
Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave;
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Bratislava
radvanszky@fns.uniba.sk

High-resolution melting (HRM) analýza PCR produktov s využitím špecifickej dsDNA viažucej farbičky LCGreen je pomerne nedávno zavedená metóda na rýchly a spoľahlivý screening mutácií a jednonukleotidových polymorfizmov a na ich genotypizáciu. HRM analýza umožňuje detekciu a genotypizáciu polymorfizmov a mutácií v oblasti celého PCR amplikónu bez využitia značených oligonukleotidov a bez potreby „post-PCR“ manipulácií s produktami. Je založená na metóde analýzy krivky teploty topenia PCR produktov pomocou dsDNA viažucej fluorescenčnej farbičky.
V predloženej práci sme sa zaoberali možnosťou využitia novej dsDNA viažucej farbičky EvaGreen (vyvinutej pre real-time PCR) v spojení s HRM analýzou. Pre tento účel bol v prítomnosti farbičky EvaGreen amplifikovaný 169bp fragment ľudského GJB2 génu, obsahujúci W24X lokus. Mutácia W24X je zapríčinená zmenou nukleotidu G na A. Vo vzorkách pacientov s nesyndrómovou hluchotou (zapríčinenou okrem iných aj touto mutáciou) a v kontrolných vzorkách sme následne stanovili prítomnosť, alebo neprítomnosť tejto mutácie pomocou HRM analýzy. Genotyp vyšetrených vzoriek bol vopred stanovený pomocou iných genotypizačných metód (ARMS PCR, sekvenačná analýza). Amplikóny 3 rôznych genotypov (wild-type, heterozygot a homozygot pre mutáciu) pri použití štandardných vzoriek so známym genotypom boli jednoznačne odlíšiteľné na základe špecifického tvaru ich kriviek teploty topenia. Podľa výsledkov HRM analýzy s využitím farbičky EvaGreen, sa od týchto sekvenčných variantov (ktorých identifikácia bola cieľom práce) dali tiež odlíšiť heterozygotné vzorky nesúce okrem W24X mutácie aj inú mutáciu (V37I), resp. polymorfizmus (V27I). Na základe našich výsledkov sme dospeli k záveru, že HRM analýza špecifických PCR produktov s využitím farbičky EvaGreen môže byť vhodnou metódou na identifikáciu špecifických sekvenčných variant.

P219

The new HPLC method using monolithic technology for simultaneous determination of vitamin D2, D3 and 25(OH)D3 in human serum

Kašparová M., Krčmová L., Solichová D., Urbánek L., Žďánský P., Sobotka L., Solich P.
Department of Analytical Chemistry, Charles University, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic,
Department of Metabolic Care and Gerontology, Charles University Medical School & Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic
marketa.kasparova@faf.cuni.cz

Vitamin D deficiency has been associated with increased risk of osteoporosis, osteomalacia, cardiovascular disease, diabetes mellitus, and cancer, especially of the colon and prostate. This deficit can be observed in the case of its decreased intake or reduced production in human body. Decrease production of active form of vitamin D (1,25(OH)2D3) is significant in patient with kidney damage.
Monitoring of vitamin D and its active metabolites is important for early diagnosis of decrease function of kidney and with this related hyperparathyreosis and also during supplementation because of pleiotropic influence on organism. Radioimmunoassay is the most currently used method for the determination in biological fluids, but total time of analysis is long and negative is also production of radioactive waste and costs. Gas chromatography with mass spectrometry detection is other possibility for determination of vitamin D and its metabolites, but derivations of vitamins have to be prepared.
The aim of this study was to develop the new, fast and routine high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of vitamin D2, D3 and 25(OH)D3 in human serum using modern technologies. System of high performance liquid chromatograph Prominence Shimadzu (Kyoto, Japan) composed by: Rack changer 1C autosampler for microtitrate plates, Degasser DGU-20A5, Column Oven CTO – 20 AC, Diode array detector SPD – M20A and Communication bus module CBM-20A was used, equipped with analytical monolithic column Chromolith Performance RP-18e, 50 x 4,6 mm, Merck (Darmstadt, Germany). Vitamin D2, D3 and 25(OH)D3 were monitored in wavelength 265 nm. The tocol was used as internal standard.
The project was supported by GAUK 88407/2008, MSM 0021620822, MSM 0021620820 and MZO 00179906.

P220
Liquid chromatography and capillary electrophoresis for the monitoring of neopterin in cancer patiens

Krčmová L., Kalábová H., Kašparová M., Melichar B., Solichová D., Solich P., Macka M.
Department of Analytical Chemistry, Charles University, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic, Departments of Gerontology & Metabolic Care, Hradec Králové, Czech Republic, National Centre for Sensor Research and School of Chemical Sciences, Dublin City University, Dublin 9, Ireland, Medicine and Oncology & Radiotherapy Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic, Department of Oncology, Palacký University Medical School & Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic
Lenkakrcmova@seznam.cz

Determinations of neopterin levels reflect the stage of activation of the cellular immune system which is of importance in the pathogenesis and progression of various diseases, e.g., in viral infections, in autoimmune or inflammatory diseases, rejection episodes following allograft transplantation and in several malignant diseases. Neopterin is useful for predicting prognosis and follow-up in gynecological and hematological neoplasias, bronchus carcinoma and cancer of the prostate and gastrointestinal cancer.
Creatinine (CR) is a major breakdown product of mammalian metabolism produced in muscle tissue and eliminated in urine. The urinary CR is often used to correct urinary excretion of other chemical substances due to urine dilution effects, since the excretion of CR is reasonably constant throughout the day.
Neopterin can be determined in serum and urine by various analytical methods such as radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay but capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with low limit of detection, high specificity, low cost and short time analyses are methods of choice.
The aim of this study was to develop a new simple, rapid and inexpensive method for simultaneous determination of neopterin and creatinine in human urine.
The new HPLC method for the monitoring of cancer patients utilises modern technologies including new types of analytical columns and instrumentations (switching valve, special autosampler for microtitration plates). For comparison, a new simple CE method based on micellar electrokinetic separation mechanism for the simultaneous determination of neopterin and creatinine was developed.
The project was supported by GAUK 88407/2008, Marie Curie Excellence grants MEXT-CT-2004-014361 and MSM 0021620822.

P221
The impact of suckling and post-weaning period on blood chemistry

Petrovic V.
Univerzita veterinarskeho lekarstva, Klinika prezuvavcov, Komenskeho 73, Kosice
vpetrovic@centrum.sk

The aim of this study was to evaluate the impact of suckling and post-weaning period on blood chemistry in piglets. Twelve piglets of breed Large white were till the end of post-weaning period farmed according to the standards of pigs rearing used in Slovakia. The blood samples were taken from pigs at age 30 days (the end of suckling period) and 2 months (the end of post-weaning period). The haematological and immunological parameters, aspartate aminotransferase, alanine aminotrasferase, alkaline phosphatase, gamma glutamyltransferase, lactate dehydrogenase and pancreatic amylase, total proteins, total lipids, urea, glucose, total cholesterol, creatine and bilirubine, macro- and micro-elements status, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, malondialdehyde, sulfhydryl groups, vitamin A and E were assessed in blood fluids of piglets. In conclusions, the impact of suckling and post-weaning period on blood chemistry in piglets is apparent. Both phases were influenced multifactorially, at least nutrition and physiologically given extreme growthiness and development of piglets especially during 1st month of life have a significant effect on the majority of observed blood parameters at the end of suckling and post-weaning period.
Keywords: suckling and post-weaning period, piglets, blood chemistry
Supported by Grant Agency for Science, VEGA of Slovak Republic, Grant no. 1/3486/06 and by Science and Research Assistance Agency, Grant no. APVV-20-027-905
Corresponding autor: e-mail: vpetrovic@centrum.sk.

P222
Metodika stanovení délky telomer pro použití ve forensní medicíně

Auinger F., Kůdela M., Tajbrová L., Smětáková M., Jančíková M., Zídková J., Pilin A., Sajdok J.
Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze Technická 3, 166 28 Praha 6;
Ústav soudního lekařství a toxikologie 1. LF UK a VFN, Studničkova 4 Praha 2
sajdokj@vscht.cz

Telomery jsou koncové struktury eukaryotických chromozómů, které zabraňují jejich fůzi, rekombinaci a degradaci. Zkracují se při každém buněčném dělení. Ve chvíli, kdy jejich délka klesne na určitou limitní hodnotu, se již buňky dále nemohou dělit. Délka telomer se mění v závislosti na stáří buňky, opravných mechanismech a nádorovém bujení. Zkracování telomer bylo prokázáno v rozmanitých tkáních in vivo. Ačkoli je tento proces velmi dobře znám, vzájemný vztah mezi délkami telomer a věkem u více tkání konkrétního jedince nebyl zatím studován. Pro vytvoření matematického modelu zkracování telomer v lidských tkáních byla zavedena metoda stanovení telomerických fragmentů pomocí agarosové elektroforesy. Na základě experimentálních dat prokázali, že nejvhodnější pro štěpení vzorků DNA, po její izolaci, jsou restrikční endonukleasy HinfI a RsaI. Vícenásobnou analýzou jednoho vzorku se nám podařilo ověřit přesnost metody a metodou Southern blot, jsme prokázali, že agarosovou elektroforesou skutečně detekujeme telomerické sekvence Jako další referenční metoda byla testována nová jednoduchá metoda pro stanovení délky telomer. Principem metody je hybridizace DNA v mikrotitrační destičce dvěma fluorescenčními sondami. Elektroforeticky zjištěná délka telomerických restrikčních faktorů byla porovnána se signálem sond přepočteným pomocí koeficientu. Porovnáním vzorků DNA jedinců různého věku jsme zjistili, že střední hodnota délky telomer ve svalové tkání je na věku nezávislá. Potvrdili jsme hypotézu, že délka telomer na počátku vývoje konkrétních jedinců se liší. Hodnota rozptylu, který reprezentuje replikační historii buňky, vykazuje drobný nárůst s věkem.
Tato práce vznikla za podpory grantů FRVŠ 1390/2008 a GAČR 303/08/1569
Funding: MSM 6046137305 and GACR 523/06/0439.

AUTORSKÝ REJSTŘÍK:

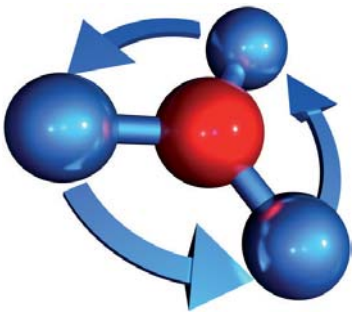
V autorském rejstříku jsou uvedeni pouze první autoři všech sdělení.

Aimova D. 65
Antalíková J. 53
Anzenbacher P. 56
Auinger F. 233
Babusikova E. 173
Bágeľová J. 114
Balková K. 101
Barák I. 128
Barančík M. 76
Barnincová L. 210
Beláňová M. 192
Bellová A. 111
Benešová E. 196
Benkovičová V. 136
Bernátová I. 171
Bezouška K. 51
Biedermannová L. 158
Bílahorková A. 117
Birková A. 230
Blahovec J. 114
Blanářová O. 102
Blažek J. 163
Blažková M. 228
Boháčová V. 74
Boušová I. 212
Breier A. 58
Brnáková Z. 144
Brtko J. 62
Bryndzová L. 107
Bučková M. 61
Bukovská G. 49
Bumba L. 142
Burešová V. 134
Bystrý V. 214
Cabálková J. 190
Cahová M. 178
Černý J. 52
Chlubnová I. 193
Chmelař J. 138
Čikošová M. 159
Čížková A. 147
Davidová A. 113
Dávidová A. 174
De Clercq E. 48
Dianišková P. 194
Dobrota D. 121
Dočolomanský P. 75
Dorňáková V. 133
Doubnerová V. 89
Dráber P. 50
Dráberová L. 143
Drahota Z. 167
Drahovská H. 140
Drozdová A. 191
Dupejová J. 136
Ďuračková Z. 166
Ďuranová M. 193
Durchan M. 88
Duretz B. 227
Ehrlichova M. 124
Fábryová K. 54
Farkašovská J. 137
Fecková L. 97
Fedunová D. 115
Fránek M. 224
Frébort I. 79
Fusek M. 160
Gardian Z. 83
Gazova Z. 113
Gerová M. 106
Gibalová L. 77
Grebeňová D. 221
Grubhoffer L. 187
Grznárová P. 139
Hajdúch M. 122
Halásová Z. 141
Halbhuber Z. 107
Halgašová N. 105
Hampl A. 92
Hansíková H. 209
Hashimi H. 147
Hatok J. 206
Havlíčková V. 156
Havlíková S. 139
Hejzlarová K. 155
Heneberg P. 95
Herbstová M. 82
Hlaváček J. 118
Hlinková V. 100
Holada K. 111
Holubová B. 229
Holý A., Jansa P. 47
Homerova D. 98
Horáčková J. 131
Horn M. 138
Horovská Ľ. 53
Horváth A. 129
Hořejší V. 46
Houser J. 195
Hřebíček M. 143
Hrstka R. 119
Hrubá E. 71
Hubackova M. 125
Hubálek M. 218
Hudeček J. 56
Jankovičová J. 54
Janovska P. 184
Jantová S. 61
Jeleník T. 177
Jelínková I. 104
Jilkova Z. 179
Jirsa M. 202
Jirsa O. 90
Júdová J. 106
Kalousek I. 96
Kalousová M. 170
Kamanova J. 103
Kamlar M. 84
Kaplan O. 162
Kaplán P. 169
Karelová E. 161
Kašparová M. 231
Kazdová L. 178
Kennedy M. 112
Kiššová I. 151
Klímová M. 86
Kočí L. 99
Kolenová K. 191
Komárek J. 190
Konvičková J. 199
Kopáček P. 130
Kopečný D. 89
Košík I. 128
Kostlánová N. 188
Kotrbová V. 64
Kotyza J. 203
Kovářová N. 155
Kowalska M. 162
Kožíšek M. 110
Krajcikova D. 132
Kravčuková P. 205
Krčmová L. 232
Krejčová S. 200
Krejnusová I. 135
Krivošíková Z. 211
Křížová V. 70
Krupková L. 70
Kubala L. 168
Kubálková J. 105
Kučera T. 87
Kunc P. 201
Kůs V. 150
Kušnierová P. 101
Kutaš P. 96
Kyselá H. 165
Lajdová I. 98
Lakatoš B. 185
Landová M. 102
Laštovičková M. 219
Laukova M. 145
Leksa V. 50
Lexa M. 215
Líbalová H. 78
Lipšová A. 120
Luhová L. 83
Lukáčová N. 207
Luňáčková T. 161
Macášek J. 182
Machala M. 59
Majerník A. 154
Malandra A. 163

AUTORSKÝ REJSTŘÍK:

Malinovská L. 189
Malínská H. 183
Mandl M. 159
Marohnic Ch. C. 204
Martásek P. 202
Martínková L 157
Mašín J. 127
Mášová A. 219
Matějovská T. 132
Matoušek J. 80
Mazanec K. 220
Medříková D. 177
Michálková K. 194
Miko M. 60
Mikula I. 207
Mikušová K. 187
Mizerovská J. 66
Mládková J. 223
Moravčíková E. 123
Moserová M. 63
Motlík J. 92
Mrázek H. 188
Mrázová B. 64
Mrózová Z. 180
Muchová J. 172
Müller K. 91
Novak M. 52
Nováková Z. 154
Nůsková H. 156
Obernauerová M. 183
Očenášová A. 115
Odnogová Z. 104
Ohraďanová A. 93
Olejníková P. 144
Ondrovičová G. 148
Ondrušová L. 94
Országhová Z. 175
Osička R. 110
Paduchová-Chovanová Z. 167
Pánek J. 213
Paulíková H. 78
Pavelka S. 60
Pech D. 198
Pejchar P. 87
Pěnčíková K. 68
Pešák L. 198
Pešta M. 122
Peterková K. 140
Petříčková A. 73
Petrovic V. 232
Piterková J. 86
Pluskalová M. 94
Podzimek T., 164
Polčic P. 150
Poljaková J. 67
Poloncová K. 184
Pompach P. 216
Pospíšil P. 169
Pospíšilová H. 197
Pospíšilová L. 208
Powell L. W. 204
Pravenec M. 149
Prchal J. 142
Prokop Z. 157
Purchartová K. 173
Purkrtová Z. 164
Radvánský J. 231
Řezníčková J. 153
Ristvejová J. 81
Rossmeisl M. 176
Roušalová I. 125
Ryšlavá H. 90
Šabatková Z. 158
Šalplachta J. 222
Schreiberova A. 208
Šebo P. 51
Sedláček V. 141
Sedlak J. 119
Šedo A. 109
Selicharová I. 217
Selinger M. 201
Šemberová L. 182
Šereš M. 62
Ševčíková B. 97
Šimečková P. 72
Šimkovič M. 116
Šimočková M. 180
Šístková J. 65
Skalníková H. 216
Škarydová L. 72
Skender B. 124
Skládal P. 225
Škopek J. 117
Skoumalová A. 171
Skultety L. 217
Slabý O. 93
Slámová K. 195
Šmehilová M. 84
Smetana K. Jr. 186
Šmidák R. 100
Šmídová Z. 174
Šmigáň P. 149
Špániková A. 76
Spiwok V. 215
Springer D. 121
Staněk O. 116
Staneková Z. 134
Staňková B. 181
Stiborová M. 57
Stibůrek L. 148
Štich V. 179
Stránská J. 85
Střeleček T. 200
Strnad H. 213
Stropkovská A. 133
Stulík J. 127
Sulova Z. 75
Šustrová M. 212
Švéda M. 99
Svobodová M. 66
Svozilová Z. 85
Szotáková B. 68
Těsnohlídková L. 199
Tichá M. 230
Tomandl J. 126
Trilecová L. 71
Tůma Z. 220
Tvrzická E. 176
Tylichová M. 80
Ugorčáková J. 108
Uhnáková B. 73
Ulbrich P. 129
Ulbrichová D. 206
Ulrichová J. 58
Umannová L. 69
Urban. J. 226
Urbánková T. 197
Vaclavikova R. 120
Valkovičová L. 103
Vancová M. 192
Vaněk O. 218
Vantová Z. 74
Vargovič P. 146
Vejvoda V. 165
Vermachová M. 222
Vidová B. 145
Viglasky V. 225
Viktorínová A. 209
Vítek L. 203
Vítková M. 224
Voráčková I. 137
Vozár I. 210
Vrbacký M. 151
Vykopalová L. 69
Vyroubalová Š. 82
Vytášek R. 170
Wenchich L. 152
Wiesner I. 91
Wilhelm J. 166
Wilhelmová N. 1 68
Wsól V. 57
Zachová K. 55
Zajoncová L. 221
Žáková L. 109
Zatloukalová J. 63
Zažímalová E. 79
Žbodáková O. 123
Zeisbergerová M. 223
Zelinka I. 214
Zeman I. 152
Zidek V. 77
Živná L. 67

ISBN 80-86313-21-2
Název: Program, sborník přednášek a posterů
Autor: Radim Černý
Vydavatel: JPM Tisk s.r.o.
Vazba: V2
Vydání: 1
Měsíc a rok vydání: září 2008



34th FEBS Congress

July 4 - 9, 2009

Prague, Czech Republic

Life's Molecular Interactions

- Molecular Interactions
- Social Life of the Cell
- Organism, the Network of Interactions

Federation of European Biochemical Societies

Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology

Latest information available on **www.febs2009.org**

PROGRAM XXI. BIOCHEMICKÉHO SJEZDU ČSBMB A SSBMB V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

NEDĚLE 14. 9. 2008

14:00	Registrace
16:30	**Zahájení sjezdu / SÁL A**
	Zprávy předsedů společností Vyhlášení cen Úvaha o reformě vědy
18:00 – 18:50	**Plenární přednáška: Václav Hořejší / SÁL A**
19:00	**Společenský večer Areál Jihočeské univerzity**

PONDĚLÍ 15. 9. 2008

8:00	Registrace
8:30 – 9:20	**Plenární přednáška: Antonín Holý / SÁL A Petr Jansa**
9:30 – 13:00	**Jednání sekcí**
	Molekulární imunologie / SÁL B Xenobiochemie / SÁL A Rostlinná biochemie a molekulární biologie / SÁL C
13:00 – 14:00	Oběd
14:00 – 17:30	**Jednání sekcí**
	Molekulární a buněčná biologie I. / SÁL A Proteiny a peptidy / SÁL B Biochemie nádorů / SÁL D Viry, bakterie paraziti / SÁL C
20:15	**Divadelní představení Sál Metropole v centru ČB**

ÚTERÝ 16. 9. 2008

8:00	Registrace
8:30 – 12:00	**Jednání sekcí**
	Molekulární a buněčná biologie II. / SÁL A Bioenergetika / SÁL C Proteinové inženýrství a biotechnologie / SÁL B Volné radikály v biochemii / SÁL D
12:10 – 13:00	**Plenární přednáška: Erik De Clercq / SÁL A**
13:00 – 14:00	Oběd
	Volné odpoledne
	Exkurze a výlety

STŘEDA 17. 9. 2008

8:00	Registrace
8:30 – 12:00	**Jednání sekcí**
	Biochemie lipidů a membrán / SÁL B Glykobiochemie / SÁL C SOČ / SÁL D Pathobiochemie / SÁL A
12:10 – 13:00	**Plenární přednáška: Gabriela Bukovská / SÁL A**
13:00 – 14:00	Oběd
14:00 – 17:30	**Jednání sekcí**
	Bioinformatika / SÁL B Proteomika / SÁL D Bioanalytické metody / SÁL C
Závěr sjezdu	

Přednáškové prostory:
A = KH - Kongresová hala
B = posluchárna B-1
C = posluchárna B-2
D = posluchárna B-3

CBT
CONGRESS BUSINESS TRAVEL Ltd.
www.cbttravel.cz