

Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, člen FEBS
a IUBMB
Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU v Bratislave
Centrum biovied, SAV
Občianske združenie Veda a život

DROBNICOV MEMORIÁL

10. ROČNÍK

Penzión Lomnický, Stará Lesná
11. – 13. september 2019



Zborník príspevkov a program

Editori

Boris Lakatoš, Albert Breier, Zdena Sulová



prof. Ing. Ľudovít DROBNICA, DrSc.

DROBNICOV MEMORIÁL

10. ročník

11. – 13. september 2019

Penzión Lomnický, Stará Lesná

ISBN 978-80-972752-6-6

Redakčná úprava: doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.

Vydal: Centrum biovied - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied,
Bratislava 2019

Spomienka na prof. Ing. Ľudovíta Drobnicu, DrSc.

Narodil sa 30. septembra 1930 v Trnave. Po skončení vysokoškolského štúdia v Brne v roku 1953 nastúpil na Katedru technickej mikrobiológie a biochémie Chemickej fakulty Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave. Tu prešiel všetkými učiteľskými stupňami. Na fakulte patrila medzi prvých vedeckých ašpirantov. Hodnosť kandidáta vied získal už v roku 1958. Docentom bol v odbore Biochémia a fyziológia mikroorganizmov od roku 1964. Vedeckú hodnosť doktora vied získal na Ústave organickej chémie a biochémie v Prahe pre odbor Biochémia v roku 1973. Bohužiaľ, profesorom sa z politických dôvodov nestal ani do svojej predčasnej smrti v roku 1980 (napriek tomu, že vychoval viac než 100 diplomantov a viac než 20 ašpirantov). Bol ním menovaný po zmenách v roku 1989 in memoriam.



Prof. Drobnica v rámci svojej nesmierne bohatej výskumnej činnosti založil, rozvinul a vybudoval na Slovensku vedeckú školu týkajúcu sa problematiky mechanizmu účinku prírodných a syntetických látok a vzťahov medzi ich štruktúrou, účinnosť určujúcimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami a biologickými aktivitami, a to s ohľadom na farmaceuticko-medicínske, poľnohospodársko-potravinárske i chemicko-ekologické aspekty použitia (aplikácie v praxi). Ťažisko jeho záujmu sa v tomto smere sústredilo na izotiokyanáty a ich prírodné prekurzory, predovšetkým glukozinoláty. Pod jeho vedením na stovkách prírodných i novosyntetizovaných derivátov boli študované chemické, biochemické i fyziologické parametre interakcií s enzýmami a inými izolovanými biokomponentami, subcelulárnymi partikulami, bunkovými i nadcelulárnymi modelmi a to tak z oblasti mikrobiálnej, rastlinnej, resp. živočíšnej ríše. Príslušné zistenia boli predmetom vyše 100 publikácií, 52 patentov, viac ako 200 vystúpení na vedeckých konferenciách, z nich viaceré prof. Drobnica ako medzinárodné organizoval u nás doma v Smoleniciach. Systematický výskum izotiokyanátov vyústil vydaním monografie *The Chemistry of –NCS group* vo vydavateľstve John Willey a zavedením p-brómfenylizotiokynátu do výroby a využívania v praxi ako veterinárneho liečiva. Bohužiaľ z dôvodu predčasnej smrti sa mu už nepodarilo dokončiť a vydať monografiu *The biology of –NCS group*.

Okrem izotiokyanátovej problematiky prof. Drobnica so svojimi kolegami a ašpirantami venoval pozornosť výskumu rôznych xenobiotík, regulácii energeticko-uhlíkového metabolizmu, dimorfizmu kvasiniek, nadprodukcii primárnych metabolitov, imobilizovaným biosystémom, prežívaniu mikroorganizmov v nepriaznivých (stresových) podmienkach, atď.

Výsledkom týchto výskumných aktivít bola minimálne ďalšia stovka vedeckých prác v renomovaných časopisoch a mnohé ďalšie publikačné produkty. Spomínané témy sa stali základom celoživotného výskumu jeho žiakov, z ktorých mnohí sú významnými predstaviteľmi biochemických, mikrobiologických, fyziologických a biotechnologických vied nielen na Slovensku, ale aj vo svete.

Prof. Drobnica okrem pedagogickej a vedeckej práce pracoval aktívne v domácich a zahraničných vedeckých spoločnostiach, v odborných komisiách pre obhajoby dizertačných prác, vo vedeckých a edičných radách ústavov a vydavateľstiev, úzko spolupracoval s praxou. Popri tom bol v mladosti výkonným športovcom, perfektne hral šach, aktívne spieval, výborne hral na klavíri, bol veľmi spoločenský. Jeho veľkosť spočívala predovšetkým v excelentnej schopnosti rozvoja teoretických predstáv experimentálnymi cestami. Bol veľmi náročný na rozsah, hĺbku, kvantitu i kvalitu experimentálnej práce. Vyznačoval sa obrovskou neúnnavnosťou a nadšením v laboratórnej činnosti, kritickým pohľadom k nameraným údajom a veľkou opatrnosťou pri formulovaní záverov. Významnou pre jeho prácu bola vysoká kooperativita. Spolupracoval s obrovským množstvom partnerov na svojom pracovisku, v rámci Bratislavy, Slovenska i na medzinárodnej úrovni. Perfektne vedel organizovať a vykonávať kolektívnu prácu. Okrem interdisciplinárneho prístupu k riešeniu vedecko-výskumných činností sa vyznačoval tiež schopnosťou prepájať vedu s praxou. Bol napríklad iniciátorom založenia Výskumného ústavu liečiv v Modre s prepojením na Slovakofarmu Hlohovec, zriadenia Enzýmovej poloprevádzky v Dolnej Krupej cez Výskumný ústav liehovarov a konzervární s nasmerovaním na biotechnologickú prax, atď.

Prof. Drobnica bol výnimočný tiež ako pedagóg. Vďaka svojej charizmatickej osobnosti vedel zaujať každého poslucháča. Nikdy neľutoval čas strávený so študentmi a aspirantami. Majstrovsky vedel zapáliť záujem o vedu a nasmerovať dané schopnosti. Každého vedel povzbudiť, poradiť mu, pomôcť. Absolventi sa k nemu vracali dlho po skončení štúdia. Dodnes naňho spomínajú ako na nezabudnuteľný vzor pracovitosti a ľudskosti. Jeho vedecká škola má punc vysokej kvality. Veľmi dôležitou črtou jeho osobnosti bola nekonformnosť, nebojácnosť a schopnosť byť sebou samým. Tieto vlastnosti mu v časoch totalít spôsobili nemálo ťažkostí i problémov a v konečnom dôsledku i predčasnú smrť. Až do nej však bol verný zásadám nezmieriteľnosti s pokrytectvom, povýšenectvom, aroganciou moci, obmedzovaním slobody a demokracie, päťolizačstvom. Typický pre neho bol pritom altruizmus, žičlivosť, optimizmus, pozitívne myslenie. V každom prípade však zmyslom i odkazom jeho života bola práca pre vedu a výchovu. Bola mu zdrojom potešenia pre seba a užitočnosťou pre ostatných.

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

Mgr. Mária BALAŽOVÁ, PhD.
doc. Ing. Albert BREIER, DrSc.
Ing. Katarína ELEFANTOVÁ, PhD.
RNDr. Denisa IMRICHOVÁ, PhD.
Ing. Michal KALIŇÁK, PhD.
PhDr. Zuzana KLIMEŠOVÁ
doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.
Ing. Zdena SULOVA, DrSc.

PRESEDA KOMISIE:

prof. Ing. Albert BREIER, DrSc.

ČLENOVIA KOMISIE:

Mgr. Mária BALAŽOVÁ, PhD.
RNDr. Imrich BARÁK, DrSc.
doc. Ing. Lucia BÍROŠOVÁ, PhD.
Ing. Marek BUČKO, PhD.
Ing. Vladimír FARKAŠ, DrSc.
prof. RNDr. Peter FEDOROČKO, CSc.
doc. RNDr. Anton HORVÁTH, CSc.
doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.
prof. RNDr. Peter RAČAY, PhD.
Ing. Zdena SULOVA, DrSc.
RNDr. Dušan ŽITŇAN, DrSc.

Obsah

PROGRAM:	9
ZBORNÍK PRÍSPEVKOV	13
SPONZORI DROBNICOVHO MEMORIÁLU	65

PROGRAM:

1. Deň: 11. 9. 2019 (streda)

Registrácia účastníkov počas celého dňa (od 12:00)

13:00 - 14:00 **OBED (Lunch)**

15:00 - 15:45 Otvorenie + plenárna prednáška: **Albert Breier: Ľudovít Drobnica - „Človek, vedec, učiteľ“**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

Predseda: Peter Račay, Zdena Sulová

16:00 - 16:15 **Dominika Kubalová:** Úloha lipidových partikul v kontrole degradácie fosfatidylglycerolu fosfolipázou Pgc1

16:15 - 16:30 **Marián Babinčák:** Skyrín, prírodný sekundárny metabolit s protinádorovým účinkom?

16:30 - 16:45 **Martin Škandík:** Derivát kvercetínu zmiernuje zápal v mikrogliách a znaky senescencie prostredníctvom modulácie red-ox homeostázy

16:45 - 17:00 **Lucia Pavlíková:** Nadexpresia Grp78 v P-gp pozitívnych leukemických bunkách L1210 znižuje ich citlivosť voči stresu ER indukovaného tunikamycínom.

17:00 - 17:15 **Katarína Elefantová:** Meranie mitochondriálneho membránového potenciálu pomocou JC-1 v bunkách L1210 so zvýšenou expresiou P-glykoproteínu

17:15 - 17:30 **Szilvia Kontár:** Prírodné izotiokyanáty indukujú bunkovú smrť spojenú so zvýraznením aktivácie dráhy LC3 proteínu viac u P-gp negatívnych ako u P-gp pozitívnych buniek L1210

17:30- 17:45 **PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

POSTEROVÁ SEKCIA (17:45-18:30)

Predseda: Imrich Barák, Peter Fedoročko, + celá komisia

1. **Viktória Bul'ková:** Účinok hypericínu v hypoxii so zameraním na nádorové kmeňové bunky a rezistenciu voči terapii
2. **Erika Csekés:** Protoapigenón a jeho 1'-O-butyl derivát ako perspektívne látky v liečbe melanómu

3. **Zuzana Dzurjašková:** Morfometrická analýza ventrálneho kaudálneho nervu potkana
4. **Ágnes Horváthová:** Testovanie inhibičného účinku komerčných antifungálnych látok na transglykozylázy Crh1, Crh2, Phr1 a Phr2
5. **Zuzana Konyariková:** Produkcia mykobakteriálnej galaktozyltransferázy GlfT1 za účelom jej perspektívnej štruktúrnej charakterizácie

18:30 – 20:00 **VEČERA (Dinner)**, neformálna diskusia

2. Deň: 12. 9. 2019 (štvrtok)

7:30-9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

Predseda: Albert Breier, Dušan Žitňan

9:30 - 9:45 **Martin Majerník:** Vplyv účinku hyperforínu a fotodynamickej terapie s hypericínom na expresiu vybraných angiogénnych faktorov v kolorektálnych mikronádoroch kreovaných s využitím chorioalantoickej membrány

9:45 - 10:00 **Tomáš Kyca:** Rozdiely v ubikvitinácii medzi senzitívnymi a rezistentnými bunkami línie L1210

10:00 - 10:15 **Mária Brodňanová:** Všetky cesty vedú ku stresu: vzájomná súhra tapsigargínu, tunikamycínu a imipramínu v procese indukcie stresu endoplazmatického retikula

10:15 - 10:30 **Tomáš Pagáč:** Antimikróbny potenciál syntetických derivátov alkaloidov

10:30 - 10:45 **Soňa Bernátová (Merck):** Experience the Next Revolution ZooMAb antibodies (komerčná prezentácia)

10:45 – 11:00 **PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

Predseda: Imrich Barák, Lucia Bírošová

- 11:00-11:15 **Monika Krahulcová:** Baktérie rezistentné voči antibiotikám prítomné v smoothie nápojoch a ich profil rezistencie
- 11:15-11:30 **Andrea Schenkmyerová:** Revealing structural elements driving Renilla luciferase evolvability
- 11:30-11:45 **Martina Gáliková:** Metabolism and obesity studies in the model organism *Drosophila melanogaster*
- 11:45-12:00 **Eduard Gondáš:** Metabolomická analýza vplyvu onkometabolitov na bazálny metabolizmus ľudských neuroblastomových buniek
- 12:00-12:15 **Lucia Hoppanová:** Vplyv nízkoteplotnej plazmy na sekundárny metabolizmus vláknitých húb
- 12:30-14:00 **OBED (Lunch)**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

Predseda: Mária Balážová, Anton Horváth

- 14:00 - 14:15 **Karin Savková:** Štúdium lokalizácie biosyntézy mykobakteriálneho galaktánu
- 14:15 - 14:30 **Zuzana Majerčíková:** Sledovanie expresie génov pri nádorových procesoch gliálnych buniek
- 14:30 - 14:45 **Zoltán Polozsányi:** Izolácia glukozinolátov z menej známych rastlinných druhov čeľade kapustovité
- 14:45 - 15:00 **Helena Galádová:** Štúdium rastlinných myrozináz prostredníctvom prírodných a syntetických glukozinolátov
- 15:00 - 15:15 **Dominika Hromníková:** Štúdium biologického účinku neuropeptidov a ich receptorov u kliešťa *Ixodes ricinus*
- 15:15 - 15:30 **Monika Záhorszská:** Kryštalizácia mykobakteriálnej monooxygenázy EthA
- 15:30 - 15:45 **Ján Viglaš:** Odpoveď *Neurospora crassa* na prítomnosť antifungálnych azolov – citlivosť a expresia vybraných génov
- 15:45 - 16:00 **PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

Sekcia III Biotechnológie

Predseda: Marek Bučko, Boris Lakatoš

16:00 - 16:15 **Michal Piž:** Nové metódy imobilizácie

16:15 - 16:30 **Vladimír Krasňan:** Scale-up produkcie proteínov

16:30 - 16:45 **Štefánia Hrončeková:** Príprava nanoštrukturovaného biosenzora na detekciu sarkozínu – potenciálneho biomarkera rakoviny prostaty

16:45 - 17:00 **Michal Híreš:** Nový pohľad na známe biomarkery – potenciál skorej diagnostiky rakoviny semenníkov

17:00 - 17:15 **Tatiana Petrovičová:** Využitie oxidoreduktáz pri príprave špeciálnych chemikálií.

19:00 **VEČERA (Dinner), neformálna diskusia**

3. Deň: 15. 9. 2019 (piatok)

7:30-9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

9:30-11:00 **Zasadnutie poroty (Jury meeting)**

11:15-12:00 **Vyhlásenie výsledkov súťaže mladých vedeckých pracovníkov a ukončenie 10. ročníka Drobnicovho memoriálu**

12:00-13:45 **OBED, Odchod**

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
Prednášky

Úloha lipidových partikul v kontrole degradácie fosfatidylglycerolu fosfolipázou Pgc1

Kubalová Dominika¹, Balážová Mária¹, Káňovičová Paulína¹, Malínský Jan²

¹Centrum biovied SAV, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Dúbravská cesta 9, 84104 Bratislava, Slovensko, ²Ústav experimentálnej medicíny AV ČR, Vídeňská 1083, Krč, 142 20 Praha 4, Česká republika

Fosfatidylglycerol (PG), záporne nabitý fosfolipid, predstavuje minoritnú zložku membrán kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Je syntetizovaný vo vnútornej mitochondriálnej membráne ako priamy prekursor významného kardiolipínu. Subcelulárna distribúcia PG je kontrolovaná enzymatickou aktivitou proteínu Pgc1 - fosfolipázy C špecifickej pre PG. Neprítomnosť Pgc1 spôsobuje akumuláciu PG v rôznych membránach, čo ovplyvňuje fosfolipidovú homeostázu bunky. V našej práci sme pozorovali, že fluorescenčne značený Pgc1 je výrazne lokalizovaný na povrchu lipidových partikul (LP). V týchto organelách je však proteín inaktívny. In vitro analýzy degradačnej aktivity Pgc1 ukázali, že proteín lokalizovaný v LP sa stáva funkčným v dôsledku interakcie týchto organel s membránami iných organel. Na základe našich výsledkov sme navrhli model, v ktorom lokalizácia Pgc1 do LP zabezpečuje ochranu proteínu pred degradáciou a zároveň kontrolu jeho aktivity.

Podakovanie: Prácu podporili granty VEGA 2/0165/18, MAD SAV-18-25, SAS-MOST JRP 2016/4SAV-15-02 a APVV-15-0654.

Efekt prírodného sekundárneho metabolitu skyrínu na nádorové bunkové línie kolorektálneho adenokarcinómu

Marián Babinčák¹, Rastislav Jendželovský¹, Peter Fedoročko¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Šrobárová 2, 041 54 Košice, Slovensko

Skyrín (SKR) je prírodná biomolekula s bisantrachinónovou štruktúrou, ktorá bola prvýkrát izolovaná Howardom a Raistrickom z huby *Penicillium islandicum* v roku 1954 [1]. Prírodzene sa vyskytuje vo veľkom množstve rôznych húb, lišajníkov a rastlín [1–3]. SKR je potenciálnym prekursorom v biosyntéze hypericínu [4]. Odborná literatúra obsahuje iba málo zmienok o jeho biologickom účinku. Cytotoxicita SKR a molekúl z rodiny skyrínov bola testovaná na viacerých ľudských aj zvieracích bunkových líniách rôzneho histologického pôvodu [5–8], avšak dostupná literatúra obsahuje iba málo zmienok o jeho biologickom účinku. Podľa dostupnej literatúry pôsobí ako receptor-selektívny antagonistu glukagónového receptora [9,10]. Presný mechanizmus účinku SKR však dosiaľ nie je známy.

V našich experimentoch boli použité bunkové línie ľudského kolorektálneho adenokarcinómu HCT116 a HT-29. Pri všetkých experimentoch prebiehali paralelné kultivácie v hypoxických a normoxických podmienkach v komorách s regulovateľnou atmosférou. V experimentoch boli použité koncentrácie SKR od 0,1 μ M do 20 μ M, pripravené rozpustením v DMSO na zásobný roztok s koncentráciou SKR 5 mM. Finálna koncentrácia DMSO bola vo všetkých vzorkách nižšia ako 0,5 %. Vykonané boli testy metabolickej aktivity buniek (MTT assay) po 24 a 48 hodinách, stanovenie celularity, viability, množstva apoptotických a mŕtvych buniek, ich granularity, priemernej veľkosti buniek, fázy bunkového cyklu a klonogénnej schopnosti týchto buniek.

Nami získané výsledky zo základných cytometrických testov potvrdzujú, že SKR má signifikantne negatívny účinok na metabolickú aktivitu buniek v normoxických, aj v hypoxických podmienkach. Okrem toho signifikantne znižuje viabilitu buniek so súčasným nárastom apoptotických buniek, ako aj množstvo buniek v G1 fáze bunkového cyklu vzhľadom ku prislúchajúcej kontrole. Taktiež dochádza vplyvom SKR aj k zníženiu granularity buniek (v hypoxických podmienkach) voči príslušnej kontrole. Tieto výsledky však nie je pre nedostatok relevantných zdrojov možno porovnať, avšak na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že SKR vykazuje potenciálne cytostatický efekt na nádorové bunkové línie kolorektálneho adenokarcinómu HCT116 a HT-29.

Literatúra:

- [1] Howard, B.H.; Raistrick, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 91. The colouring matters of *Penicillium islandicum* Sopp. Part 3. Skyrin and flavoskyrin. *Biochem. J.* 1954, 56, 56–65.
- [2] Nicolaou, K.C.; Papageorgiou, C.D.; Piper, J.L.; Chadha, R.K. The cytoskyrin cascade: A facile entry into cytoskyrin A, deoxyrubroskyrin, rugulin, skyrin, and flavoskyrin model systems. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2005, 44, 5846–5851.
- [3] Bräse, S.; Gläser, F.; Kramer, C.S.; Lindner, S.; Linsenmeier, A.M.; Masters, K.-S.; Meister, A.C.; Ruff, B.M.; Zhong, S. Skyrins. In: 2013; pp. 139–151 ISBN 9783709113110.
- [4] Jahn, L.; Schafhauser, T.; Wibberg, D.; Rückert, C.; Winkler, A.; Kulik, A.; Weber, T.; Flor, L.; van Pée, K.H.; Kalinowski, J.; et al. Linking secondary metabolites to biosynthesis genes

- in the fungal endophyte *Cyanoderrella asteris*: The anti-cancer bisanthraquinone skyrin. *J. Biotechnol.* 2017, 257, 233–239.
- [5] Kawai, K.; Kitamura, J.; Nozawa, Y. The binding of polyoxyanthraquinone mycotoxins, emodin and skyrin, to serum albumin. *Mycotoxins* 1984, 19, 25–29.
- [6] Ueno, Y.; Umemori, K.; Niimi, E. -C; Tanuma, S. -I; Nagata, S.; Sugamata, M.; Ihara, T.; Sekijima, M.; Kawai, K. -I; Ueno, I.; et al. Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Nat. Toxins* 1995, 3, 129–137.
- [7] Lin, L.C.; Chou, C.J.; Kuo, Y.C. Cytotoxic principles from *Ventilago leiocarpa*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 674–676.
- [8] Koul, M.; Meena, S.; Kumar, A.; Sharma, P.R.; Singamaneni, V.; Riyaz-UI-Hassan, S.; Hamid, A.; Chaubey, A.; Prabhakar, A.; Gupta, P.; et al. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Planta Med.* 2016, 82, 344–355.
- [9] Parker, J.C.; McPherson, R.K.; Andrews, K.M.; Levy, C.B.; Dubins, J.S.; Chin, J.E.; Perry, P. V.; Hulin, B.; Perry, D.A.; Inagaki, T.; et al. Effects of skyrin, a receptor-selective glucagon antagonist, in rat and human hepatocytes. *Diabetes* 2000, 49, 2079–2086.
- [10] Kurukulasuriya, R.; Link, J.T.; Madar, D.J.; Pei, Z.; Richards, S.J.; Rohde, J.J.; Souers, a J.; Szczepankiewicz, B.G. Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production. *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 123–53.

Pod'akovanie: Táto práca vznikla za podpory OP VaV: MediPark, Košice (ITMS: 26220220185) a MediPark, Košice - Fáza II. (ITMS2014+: 313011D103), spolufinancovaných zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Kvercetín-chinónový derivát: užitočný nástroj pri potláčaní zápalu mikroglíí a markerov senescencie počas starnutia

Škandík Martin¹, Račková Lucia¹

¹Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovensko

Starnutie je sprevádzané chronickým oxidačným stresom, ktorý je zapríčinený stratou schopnosti buniek udržiavať redukčne-oxidačnú homeostázu, ako aj proteostázu. Najviac náchylné na oxidačno-zápalové poškodenie sú nervový a imunitný systém, ktorých poškodenie vedie k rozvoju mnohých neurodegeneratívnych patológií [1].

Mikroglie, imunitné bunky centrálného nervového systému, sa za fyziologických podmienok zúčastňujú na udržiavaní homeostázy svojho prostredia. V závislosti od intenzity, typu a dĺžky trvania aktivačného signálu môžu prezentovať rozdielne fenotypové prejavy. V prípade, že dôjde k silnej a akútnej stimulácii receptorov rozpoznávajúcich molekulové vzorce (napr. TLR), mikroglie prezentujú pro-zápalový fenotyp, ktorého hlavnou úlohou je odstránenie patogénu prostredníctvom produkcie pro-zápalových cytokínov. Naopak pri miernej a krátkej stimulácii napríklad IL-4 dochádza k navodeniu prospešného proti-zápalového fenotypu. Avšak počas starnutia dochádza k chronickej aktivácii mikrogliových buniek v podmienkach oxidačného stresu, a taktiež v prítomnosti proteínových agregátov v zostarnutom mozgu, akým je napríklad amyloid β . Takto aktivované mikroglie produkujú ďalšie pro-zápalové mediátory, čím samé prispievajú k šíreniu zápalu [2].

Navyše dlhotrvajúce narušenie redukčno-oxidačných systémov a proteostázy má ďalekosiahly účinok na funkcionálnosť buniek. Postupnou akumuláciou oxidačne poškodených bunkových štruktúr a rozvratom katabolických dejov dochádza k rozvoju senescencie. Senescentné bunky sú charakterizované stratou proliferácie, neresponzivitou na mitogénnu signalizáciu, poruchami v mitochondriálnej fúzii a rozpade a zmenami v lyzozómoch v dôsledku akumulácie nedegradovateľného lipofuscínu. Narušenie funkčnosti mitochondrií a lyzozómov vedie k disrupcii procesu autofágie. Pochopenie funkcie a úlohy senescentných buniek je žiaduce a nevyhnutné pre správne pochopenie procesu starnutia [3].

Terapeutické princípy sa preto zamerali na hľadanie takých látok, ktoré dokážu indukovať nukleofilný stav v bunke aktiváciou obranných mechanizmov a tak potláčať poškodenie bunky dlhotrvajúcim oxidačným stresom. Medzi takéto látky radíme prírodné elektrofilny ako sú polyfenoly a chinóny [4]. V našej štúdii sme sa zamerali na derivát prírodného kvercetínu a syntetického 1,4-naftochinónu, 4-O-(2-chloro-1,4-naftochinón-3-yloxy) kvercetínu (CHNQ). Testovaný derivát, vo väčšej miere ako prekurzory, znižoval hladiny pro-zápalových mediátorov TNF α , COX-2 a iNOS, a to prostredníctvom potlačenia Nf- κ B signalizácie v LPS stimulovaných mikrogliových BV-2 bunkách. Taktiež stimuloval indukciu prospešného proti-zápalového fenotypu, ktorý je pravdepodobne regulovaný aktiváciou a stabilizáciou Nrf2 signalačnej dráhy. Kvercetín, ako aj testovaný derivát, preukázali taktiež neuroprotektívne vlastnosti. Dlhodobou kultiváciou in vitro sme boli schopní navodiť replikačne senescentný stav v ľudských fibroblastoch. Testovaný derivát prekonal markery senescencie v lyzozómoch, ako aktivitu senescentnej β -galaktozidázy a autofluorescenciu lipofuscínu. Okrem toho CHNQ preukázal pozitívny vplyv aj na mitochondriálny membránový potenciál a potlačenie produkcie intracelulárnych reaktívnych oxidantov

bez ovplyvnenia dĺžky života senescentných buniek. Po ovplyvnení CHNQ došlo taktiež k obnoveniu konverzie autofagického LC-3 proteínu, čo spolu s vylepšenou mitochondriálnou a lyzozomálnou kondíciou môže podporovať proces autofágie v zostarnutých bunkách. Vzhľadom na všetky spomenuté fakty, CHNQ predstavuje sľubnú zlúčeninu s proti-starnúcimi účinkami.

Literatúra:

1. Cabrera, A. J. R. Inflammatory Oxidative Aging: A New Theory of Aging. *MOJ Immunol.* 3, (2016).
2. von Bernhardi, R. a kol. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 7, 1–21 (2015).
3. Höhn, A. a kol. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* 11, 482–501 (2017).
4. Satoh, T. a kol. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 45–57 (2014).

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0336 a č. APVV-15-0308. Práca bola financovaná taktiež prostredníctvom grantu VEGA 2/0041/17.

Nadexpresia Grp78 v P-gp pozitívnych leukemických bunkách L1210 znižuje ich citlivosť voči stresu ER indukovaného tunikamycínom.

Pavlíková Lucia¹, Šereš Mário¹, Boháčová Viera¹, Breier Albert², Sulová Zdena¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, ²Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Leukemické bunky sa v priebehu terapie stávajú rezistentné voči širokej škále cytostatík s rôznou štruktúrou a mechanizmom pôsobenie. Jedným z najštudovanejších mechanizmov rezistencie je expresia P-glykoproteínu (P-gp), člena rodiny ABC transportérov. Expresia P-gp je sprevádzaná rezistenciou na látky, ktoré nie sú substrátom P-gp a zmenami v metabolických a regulačných dráhach (1). V našich predchádzajúcich prácach sme zistili, že P-gp pozitívne sublinie myších leukemických buniek L1210 (R a T) sú rezistentné na látky vyvolávajúce stres endoplazmatického retikula (ER) thapsigargin a tunikamycín na rozdiel od P-gp negatívnych parentálnych buniek (S) (2). Cieľom tejto práce bolo, aspoň čiastočne objasniť mechanizmus rezistencie P-gp pozitívnych buniek na inhibítor N-glykozylácie tunikamycín. Zistili sme, že tunikamycín v koncentrácii 0,1 μ M (netoxická koncentrácia pre všetky testované sublinie buniek), indukuje nárast počtu buniek v G1 fáze bunkového cyklu u S buniek. V P-gp pozitívnych R a T bunkách sme tento efekt tunikamycínu nepozorovali. V S bunkách indukuje tunikamycín zvýšenú expresiu CHOP a sXBP1 (markerov stresu ER) v porovnaní s R a T bunkami. Rezistentné bunky majú zvýšenú expresiu stresových šaperónov Grp78 a Grp94 v porovnaní so senzitívnymi bunkami. Nadexpresia šaperónu Grp78 v senzitívnych bunkách znížila expresiu stresového markru CHOP indukovanú tunikamycínom a aj citlivosť S buniek na stres ER.

Literatúra:

1. Breier, et al, New insight into P-Glycoprotein as a drug target, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2013,1, 159-170
2. M. Šereš et al, Overexpression of P-glycoprotein in L1210/VCR cells is associated with changes in several endoplasmic reticulum proteins that may be partially responsible for the lack of thapsigargin sensitivity *Gen. Physiol. Biophys.* 2008, 27, 211–221

PodĎakovanie: Táto práca bola vypracovaná vďaka podpore: APVV-14-0753, APVV-15-0303, VEGA 2/0122/17, VEGA 2/0157/18, VEGA 2/0159/19, VEGA 2/0070/19.

Meranie mitochondriálneho membránového potenciálu s JC-1 v bunkách L1210 exprimujúcich P-glykoproteín

Katarína Elefantová¹, Boris Lakatoš¹, Albert Breier^{1,2}, Zdena Sulová²

¹Ústav biochémie a mikrobiológie FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava; ²Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky Centra Biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

Sledovanie mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi$, MMP) v intaktných bunkách poskytuje informácie nevyhnutné pre posudzovanie ich fyziopatologického stavu [1]. Pokles MMP sa často objavuje počas indukcie bunkovej smrti neoplastických buniek vyvolanej liečivom [2]. JC-1 (kationová fluorescenčná sonda) sa v bunkách preferenčne lokalizuje v mitochondriách a považuje sa za spoľahlivú fluorescenčnú sondu pre posudzovanie zmien v MMP [3]. Pre túto farbičku sú typické dve fluorescencie (obe excitované pri 488 nm), a to: červená fluorescencia J-agregátov (emisné maximum pri 590 nm) pri vyššom MMP a zelená fluorescencia J-monomérov (emisné maximum ~ 529 nm) v mitochondriách so zníženým MMP [4]. Pomer červenej/zelenej fluorescencie nezávisí na tvare mitochondrií, hustoty, či veľkosti, ale je závislý iba od membránového potenciálu. Pomocou konfokálnej mikroskopie tak môžeme sledovať, či v tej istej bunke majú mitochondrie rovnaký MMP [4]. JC-1 môžeme využívať aj v prietokovej cytometrii pri štúdiu MMP živých buniek [5].

Neoplastické bunky sú schopné vyvinúť si fenotyp viacliekovej rezistencie (*multidrug resistance*, MDR), čo znamená, že bunky vykazujú výraznú odolnosť voči širokej skupine toxických látok s rozličnými štruktúrami a rôznymi mechanizmami indukcie bunkovej smrti [6]. Hlavný mechanizmus rozvoja MDR je spájaný s efluxnou aktivitou transportérov plazmatickej membrány, ktoré najčastejšie patria do rodiny ABC transportérov [7, 8]. ABCC1-ABCC3 (taktiež známe ako proteíny asociované s viacliekovou rezistenciou), ABCG2 (známy ako proteín rezistencie prsníkových nádorov) a predovšetkým ABCB1 známy ako P-glykoproteín (P-gp) alebo MDR1 proteín sú najčastejšie popísané molekulárne príčiny vzniku MDR v neoplastických bunkách [9]. O týchto transportéroch je známe, že sú zodpovedné za výrazné zníženie citlivosti buniek voči veľkej skupine štruktúrne odlišných cytotoxických liečiv [10]. Mnohé vnútrobunkové fluorescenčné indikátory sú substrátmi týchto transportérov [11]. Z tohto dôvodu môžu tieto transportéry predstavovať prekážku pri bezproblémovom použití fluorescenčných farbív pri analýze a charakterizácii MDR neoplastických buniek prietokovou cytometriou alebo konfokálnou mikroskopiou [5]. Okrem iných, aj JC-1 je substrátom P-gp a môže sa používať pri citlivom meraní efluxnej aktivity P-gp v intaktných bunkách [12, 13]. Bunkový eflux JC-1 zabezpečený P-gp môže do značnej miery znížiť vnútrobunkový obsah farbiva, čo má za následok, že jeho množstvo v mitochondriách nie je postačujúce a nedochádza ku vzniku červenej fluorescencie J-agregátov v týchto organelách [14]. To sa môže mylne považovať za stratu MMP v P-gp pozitívnych bunkách. Z tohto dôvodu je v P-gp pozitívnych bunkách nutné inhibovať jeho efluxnú aktivitu vhodným inhibítorom, aby bolo zabezpečené dostatočné plnenie sa buniek JC-1, ktoré je nevyhnutné pre správne meranie MMP. V našej práci sme sa zamerali na rozdielne účinky známych

inhibítorov P-gp (verapamil VER, cyklosporín A CSA a tariquidar TQR) na farbenie a fluorescenciu JC-1 P-gp pozitívnych a P-gp negatívnych buniek. Použili sme tieto varianty myšej leukemickej línie L1210: P-gp negatívne parentálne bunky (S), P-gp pozitívne R bunky, ktoré boli získané selekciou S buniek v médiu s postupne sa zvyšujúcou koncentráciou vinkristínu [15] a P-gp pozitívne T bunky, ktoré boli pripravené transfekciou S buniek génom kódujúcim ľudský P-gp [16].

V súlade s vyššie uvedeným sme v P-gp pozitívnych bunkách nepozorovali červenú fluorescenciu JC-1, ktorá bola prítomná v P-gp negatívnych bunkách. Zistili sme, že verapamil a cyklosporín A neboli schopné u P-gp pozitívnych R a T bunkách zabezpečiť plnenie s JC-1 na úrovni, akú sme pozorovali pri S bunkách. Naopak, nekompetitívny vysokoafinitný inhibítor P-gp tariquidar plne obnovil akumuláciu JC-1 a boli sme schopní detegovať typickú červenú fluorescenciu J-agregátov. Meraním fluorescencie JC-1 v prítomnosti tariquidaru sme zistili, že P-gp pozitívne R a T bunky majú veľmi podobnú úroveň MMP [17]. Možno teda uzavrieť, že tariquidar je vhodný ako inhibítor P-gp pre charakterizáciu MMP v bunkách s exprimovaným P-gp.

Literatúra:

1. Seppet, E.; Gruno, M.; Peetsalu, A.; Gizatullina, Z.; Nguyen, H.P.; Vielhaber, S.; Wussling, M.H.; Trumbeckaite, S.; Arandarcikaite, O.; Jerzembeck, D., et al. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2009, 10, 2252-2303.
2. Ortiz-Lazareno, P.C.; Bravo-Cuellar, A.; Lerma-Diaz, J.M.; Jave-Suarez, L.F.; Aguilar-Lemarroy, A.; Dominguez-Rodriguez, J.R.; Gonzalez-Ramella, O.; De Celis, R.; Gomez-Lomeli, P.; Hernandez-Flores, G. Sensitization of u937 leukemia cells to doxorubicin by the mg132 proteasome inhibitor induces an increase in apoptosis by suppressing nf-kappa b and mitochondrial membrane potential loss. *Cancer Cell Int* 2014, 14, 13.
3. Salvioli, S.; Ardizzoni, A.; Franceschi, C.; Cossarizza, A. Jc-1, but not dioc6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 1997, 411, 77-82.
4. Chazotte, B. Labeling mitochondria with jc-1. *Cold Spring Harb Protoc* 2011, 2011.
5. Cottet-Rousselle, C.; Ronot, X.; Leverve, X.; Mayol, J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* 2011, 79, 405-425.
6. Du, Y.; Chen, B. Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia. *Drug Des Devel Ther* 2017, 11, 1255-1261.
7. Breier, A.; Barancik, M.; Sulova, Z.; Uhrik, B. P-glycoprotein--implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005, 5, 457-468.
8. Breier, A.; Gibalova, L.; Seres, M.; Barancik, M.; Sulova, Z. New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med Chem* 2013, 13, 159-170.
9. Gillet, J.P.; Gottesman, M.M. Advances in the molecular detection of abc transporters involved in multidrug resistance in cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2011, 12, 686-692.
10. Sharom, F.J. Abc multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008, 9, 105-127.
11. Nerada, Z.; Hegyi, Z.; Szepesi, A.; Toth, S.; Hegedus, C.; Varady, G.; Matula, Z.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Telbisz, A. Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of abc multidrug transporters at a single cell level. *Cytometry A* 2016, 89, 826-834.
12. Kuhnel, J.M.; Perrot, J.Y.; Faussat, A.M.; Marie, J.P.; Schwaller, M.A. Functional assay of multidrug resistant cells using jc-1, a carbocyanine fluorescent probe. *Leukemia* 1997, 11, 1147-1155.
13. Legrand, O.; Perrot, J.Y.; Simonin, G.; Baudard, M.; Marie, J.P. Jc-1: A very sensitive fluorescent probe to test pgp activity in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 97, 502-508.
14. Chaoui, D.; Faussat, A.M.; Majdak, P.; Tang, R.; Perrot, J.Y.; Pasco, S.; Klein, C.; Marie, J.P.; Legrand, O. Jc-1, a sensitive probe for a simultaneous detection of p-glycoprotein activity and apoptosis in leukemic cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2006, 70, 189-196.

15. Polekova, L.; Barancik, M.; Mrazova, T.; Pirker, R.; Wallner, J.; Sulova, Z.; Breier, A. Adaptation of mouse leukemia cells I1210 to vincristine. Evidence for expression of p-glycoprotein. *Neoplasma* 1992, 39, 73-77.
16. Sulova, Z.; Ditte, P.; Kurucova, T.; Polakova, E.; Rogozanova, K.; Gibalova, L.; Seres, M.; Skvarkova, L.; Sedlak, J.; Pastorek, J., et al. The presence of p-glycoprotein in I1210 cells directly induces down-regulation of cell surface saccharide targets of concanavalin a. *Anticancer Res* 2010, 30, 3661-3668.
17. Elefantova, K.; Lakatos, B; Kubickova, J; Sulova, Z; Breier, A. Detection of Mitochondrial Membrane Potential by Cationic Dye JC-1 in L1210 Cells with Massive Overexpression of Plasma Membrane ABCB1 Drug Transporter. *Int J Mol Sci* 2018, 19.

Pod'akovanie: Prácu podporili grantové agentúry APVV-14-0334 a APVV-15-0303, Výskumná agentúra v rámci projektu Dobudovanie infraštruktúry pre moderný výskum civilizačných ochorení (ITMS 26230120006). Autori ďakujú STU za finančnú podporu v rámci Grantovej schémy na podporu excelentných tímov mladých výskumných pracovníkov.

Prírodné izotiokyanáty indukujú bunkovú smrť spojenú so zvýraznením aktivácie dráhy LC3 proteínu viac u P-gp negatívnych ako u P-gp pozitívnych buniek L1210

Szilvia Kontár¹, Denisa Imrichová¹, Anna Bertová¹, Albert Breier^{1,2}, Zdena Sulová¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko; ²Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Glukozinoláty ako sekundárne metabolity pozostávajúce z tioglykozidových skupín sa vyskytujú v rôznych typoch rastlín z čeľade kapustovité. V dôsledku ich enzýmového štiepenia katalyzovaného myrozínázou sa uvoľňujú izotiokyanáty, ktoré sú z dôvodu mnohých biologických aktivít rozsiahle študované. Súčasnú štúdiu sa zameriavajú hlavne na ich antioxidantné a antikarcinogénne účinky. V neoplastických bunkách preukázali vplyv na moduláciu kľúčových signálnych dráh a génov zapojených do indukcie apoptózy, aktiváciu detoxifikačných enzýmov, potlačanie bunkovej proliferácie, reguláciu génov bunkového cyklu, inhibíciu metastázovania, redukciu poškodenia DNA a potlačanie angiogenézy. V našich experimentoch sme študovali vplyv dvoch prírodných izotiokyanátov - alyl izotiokyanátu (AITC) a sulforafanu (SFN) na myšiu leukemickú bunkovú líniu (L1210/S) bez expície P-glykoproteínu (P-gp) a od nej odvodené P-gp pozitívne bunkové línie (L1210/R a L1210/T). Antiproliferatívny účinok príslušných izotiokyanátov sme potvrdili meraním počtu buniek pomocou CASY Model TT Cell Counter (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA). V prípade SFN sa ukázalo, že už pri nižších koncentráciách mal väčší inhibičný vplyv na S bunky v porovnaní s AITC. Zaujímavým zistením v prípade AITC je, že rezistentné bunkové varianty R a T po 48 hodinách vykazovali vyššiu citlivosť na tento izotiokyanát v porovnaní s S bunkami. Na rozdiel od toho, pri nižších koncentráciách SFN a čiastočne aj AITC sme sledovali spočiatku významný nárast metabolickej aktivity v P-gp pozitívnych bunkových variantoch pri meraní pomocou MTS testu. Vyššie koncentrácie (15-30 $\mu\text{mol/l}$) spomínaných látok už pôsobili inhibične aj na tieto bunkové varianty. Sledovaním bunkového cyklu po ovplyvnení buniek so zvyšujúcou sa koncentráciou SFN sme pozorovali mierny nárast počtu buniek v G0/G1 fáze, a to v rezistentných bunkových variantoch. Na rozdiel od toho AITC indukoval skôr nárast počtu buniek v G2/M fáze. Ďalej sme sledovali spôsob bunkovej smrti pomocou dvojitého farbenia s FITC-Anexín V a propídium jodidom. Tieto výsledky ukázali nárast počtu buniek značených Anexínom V a súčasne aj propídium jodidom, nepozorovali sme navýšenie počtu buniek v skorej fáze apoptózy (značené Anexínom V). Jedná sa teda o bunkovú smrť bez výrazných charakteristík čistej apoptózy alebo nekrózy. Senzitívne bunky obsahujú nižšie množstvo antiapoptotického proteínu Bcl-2 ako rezistentné varianty. Proapoptotický proteín Bax sa v oboch typoch buniek nachádza približne v rovnakom množstve. Ani SFN, ani AITC nespôsoboval výrazné zmeny v koncentrácii týchto proteínov. Oba izotiokyanáty však

znižovali hladinu markerov kanonickej dráhy NF- κ B a naopak, zvyšovali hladinu markerov nekanonickej varianty tejto dráhy. U S buniek a v menšom rozsahu aj u R a T buniek sme zaznamenali aktivované formy LC3B proteínu po aplikácii SFN, čo naznačuje indukciu mechanizmov autofágie. Z našich výsledkov získaných analýzou spôsobu bunkovej smrti možno uzavrieť, že pôsobením týchto látok dochádza k bunkovej smrti, pravdepodobne bez výrazného príspevku vnútornej mitochondriálnej dráhy apoptózy. Naše priebežné výsledky naznačujú, že vplyvom týchto látok pravdepodobne dochádza k autofágii.

PodĎakovanie

Táto práca je podporená: APVV-14-0334, APVV-16-0439, APVV-15-0303, VEGA 2/0122/17, VEGA 2/0070/19.

Vplyv účinku hyperforínu a fotodynamickej terapie s hypericínom na expresiu vybraných angiogénnych faktorov v kolorektálnych mikronádoroch kreovaných s využitím chorioalantoickej membrány

Martin Majerník¹, Rastislav Jendželovský¹, Marián Babinčák¹, Ján Košuth¹, Juraj Ševc¹, Zuzana Tonelli Gombalová¹, Zuzana Jendželovská¹, Monika Buríková², Peter Fedoročko¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Šrobárová 2, 041 54, Košice, Slovensko,

²Slovenská akadémia vied, Ústav experimentálnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

Koncept antiangiogénnej terapie rozvinul Judah Folkman ešte v roku 1971. Mechanizmus nádorovej angiogenézy je považovaný za jeden z charakteristických znakov nádorového ochorenia [1–3]. Hlavné uplatnenie antiangiogénnej terapie je v oblasti liečby malých nádorov (priemer 2-3 mm), s vysokým angiogénnym potenciálom. Z tohto hľadiska sú hlavným cieľom terapie nádory mozgu a karcinómy [4]. Štúdium protinádorového účinku sekundárnych metabolitov ľubovníka bodkovaného vo vzťahu ku kolorektálnemu karcinómu (CRC) patrí medzi ústredné témy našej pracovnej skupiny. To bol zároveň jeden z hlavných dôvodov, prečo sme v našich analýzach pracovali s tromi nádorovými bunkovými líniami odvodenými od CRC. Angiogenéza predstavuje komplexný proces a z tohto hľadiska je pri jeho štúdiu nutné pracovať s vhodnými experimentálnymi modelmi, s čo najvyššou mierou relevancie. Pre experimentálne účely sme preto okrem konvenčne využívaného 2D bunkového modelu využili aj 3D bunkový model a experimentálne pripravené mikronádory s využitím chorioalantoickej membrány (CAM) aviárneho embrya prepelice japonskej.

O aktuálnosti analýz účinku fotodynamickej terapie s hypericínom (HY-PDT) a hyperforínu (HP) na angiogénny mechanizmus v CRC svedčí aj skutočnosť, že vo vzťahu k HY-PDT boli doposiaľ realizované analýzy uskutočnené iba s využitím bunkových línií odvodených od karcinómu močového mechúra [5,6] a karcinómu nosohltana [7–9]. Výsledky analýz vo vzťahu k uvedeným typom nádorového ochorenia poukazujú na možný proangiogénny efekt HY-PDT už v skorých fázach po terapeutickom zásahu [6,7].

Vo vzťahu k HP boli analýzy uskutočnené s využitím nádorových bunkových línií B-lymfocytickej leukémie [10] a nádorových bunkových línií meduloblastómu a glioblastómu [11]. Z doposiaľ získaných výsledkov nemožno konštatovať pro a ani antiangiogénny účinok HP, keďže výsledky analýz poukazujú na bunkovo špecifický efekt.

Na základe uvedených skutočností sme považovali realizáciu analýz zameraných na štúdium účinku HY-PDT a HP na angiogenézu v CRC za potrebnú. Naším cieľom bolo preto vyhodnotiť účinok HY-PDT a HP s využitím relevantných experimentálnych modelov. Dokázali sme, že všetky vybrané nádorové bunkové línie disponujú potenciálom kreovať 3D bunkové modely ako aj experimentálne mikronádory štrukturálne prepojené s tkanivom CAM. Pozorovali sme, že cytotoxický efekt oboch zvolených terapeutických postupov je vo významnej miere závislý od štrukturálnych charakteristík experimentálneho modelu. Metódou fluorescenčnej

mikroskopie sme dokázali penetráciu hypericínu do nádorovej masy, pričom výsledky molekulárnych analýz poukázali na vhodnosť využitia experimentálneho modelu mikronádorov pre potreby výskumu angiogenézy v CRC. Celkovo teda možno konštatovať, že účinok oboch terapeutických postupov je bunkovo špecifický a "modelovo" závislý. Z hľadiska zmien spôsobených účinkom HY-PDT bola zvýšená expresia pozorovaná na úrovni mRNA. Naopak, v prípade analýz účinku HP boli alterácie expresie detegované aj na proteínovej úrovni. Tieto zistenia môžu zároveň v ovplyvnených skupinách vzoriek naznačovať na indukciu angiogénneho spínača, ktorú možno asociovať aj s potenciálnou znovu obnovou nádorového rastu.

Literatúra:

- [1.] Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2017, 7, 1016–1036.
- [2.] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 57–70.
- [3.] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144, 646–74.
- [4.] Folkman, J. ISOLATION OF A TUMOR FACTOR RESPONSIBLE FOR ANGIOGENESIS. *J. Exp. Med.* 1971, 133, 275–288.
- [5.] Bhuvanewari, R.; Yuen, G.Y.; Chee, S.K.; Olivo, M. Hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with Avastin (bevacizumab) improves tumor response by downregulating angiogenic proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007, 6, 1234–1245.
- [6.] Bhuvanewari, R.; Gan, Y.K.; Lucky, S.S.; Chin, W.W.L.; Ali, S.M.; Soo, K.C.; Olivo, M. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol. Cancer* 2008, 7, 1–14.
- [7.] Bhuvanewari, R.; Gan, Y.Y.Y.; Yee, K.K.L.; Soo, K.C.; Olivo, M. Effect of hypericin-mediated photodynamic therapy on the expression of vascular endothelial growth factor in human nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 2007, 20, 421–428.
- [8.] Thong, P.S.-P.; Watt, F.; Tan, P.H.; Olivo, M.; Soo, K.C.; Ren, M.Q. Hypericin-photodynamic therapy (PDT) using an alternative treatment regime suitable for multi-fraction PDT. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2005, 82, 1–8.
- [9.] Yee, K.K.L.; Soo, K.C.; Olivo, M. Anti-angiogenic effects of Hypericin-photodynamic therapy in combination with Celebrex in the treatment of human nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 2005, 16, 993–1002.
- [10.] Quiney, C.; Billard, C.; Kolb, J.-P.; Fourneron, J.-D.; Mirshahi, P. Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. *Leukemia* 2006, 20, 583–589.
- [11.] Tassone, E.; Maran, C.; Masola, V.; Bradaschia, A.; Garbisa, S.; Onisto, M. Antidepressant hyperforin up-regulates VEGF in CNS tumour cells. *Pharmacol. Res.* 2011, 63, 37–43.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla s podporou: APVV-14-0154, VEGA 1/0022/19, OP VaV: MediPark, Košice (ITMS 26220220185) a MediPark Košice – Fáza II. (ITMS2014+: 313011D103).

Rozdiely v ubikvitinácii medzi senzitívnymi a rezistentnými bunkami línie L1210

Tomáš Kyca¹, Pavlíková Lucia¹, Boháčová Viera¹, Sopúchová Michaela Macková Breier Albert², Sulová Zdena¹ Katarína Šereš Mário¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko; ²Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Počas chemoterapie sa u leukemických buniek môže vyvinúť rezistencia na širokú škálu cytotoxických látok, ktoré môžu mať rozličnú štruktúru alebo mechanizmus účinku. Tento stav sa tiež zvykne označovať ako viaclieková rezistencia (Kaye, 1988) a je často sprostredkovaná transportnými proteínmi rodiny ABC (Kathawala a kol., 2015). Jedným z najviac preštudovaných členov tejto proteínovej rodiny je P-glykoproteín (P-gp), ktorého expresia sa zdá byť sekundárne spojená so zmenami niektorých metabolických a regulačných dráh (Breier a kol., 2013). Pre funkciu proteínov je kľúčové ich správne zloženie. V týchto procesoch zohrávajú dôležitú úlohu molekulárne šaperóny, ktoré interagujú s polypeptidovými reťazcami a napomáhajú k ich zloženiu. Väčšina molekulárnych šaperónov je lokalizovaná hlavne v endoplazmatickom retikule (ER), ako napr. GRP78, GRP94, kalnexín a kalretikulín (Schönthal, 2012). Prítomnosť rôznych cytotoxických látok (látky vyvolávajúce stres ER, inhibítory proteazómu), môže v bunke vyvolať akumuláciu nesprávne zložených proteínov, čo spúšťa obrannú reakciu bunky „odpoveď na nezložené proteíny“ – UPR (Avril a kol., 2017). Vtedy dochádza k zvýšenej expresii molekulárnych šaperónov, ktoré napomáhajú skladaniu nesprávne zložených proteínov (Mann a Hendershot, 2006). Ak nedôjde k ich znovuzloženiu, nesprávne zložené proteíny sú transportované do cytosolu, kde sú ubikvitinované a degradované pomocou proteazómu (ER-asociovaná degradácia proteínov, ERAD) (Hetz a kol., 2015). Proces ubikvitinácie však nemusí byť nevyhnutne spojený len s degradáciou proteínov (K48-ubikvitinácia). V súčasnej dobe sa v literatúre objavujú informácie o tzv. „neproteolytickej ubikvitinácii“ (Bhoj a Chen, 2009), ktorá môže stimulovať endocytózu, opravu DNA alebo dokonca transport proteínov (K63-ubikvitinácia) (Wang a kol., 2012). Hlavným cieľom našich experimentov bolo charakterizovať účinok bortezomibu (inhibítora proteazómu) na K48 a K63 ubikvitináciu proteínov a na expresiu vybraných molekulárnych šaperónov v P-gp pozitívnych (R, T) a P-gp negatívnych (S) variantoch buniek L1210. Zistili sme, že P-gp pozitívne (R a T) bunky boli menej citlivé na bortezomib. Ďalej sme na proteínovej úrovni detegovali zvýšenú expresiu molekulárneho šaperónu Hsp90 α v R a T bunkách, buď v neprítomnosti alebo v prítomnosti bortezomibu v porovnaní s S bunkami. Okrem toho bortezomib po 24 hodinách indukoval rozdiely v množstve K48 polyubikvitinovaných proteínov medzi P-gp negatívnymi a P-gp pozitívnymi bunkami, u ktorých sme pozorovali pokles v ubikvitinácii po 24 hodinách. K63 ubikvitinácia sa výrazne nemenila ani v jednej z testovaných sublínií L1210 buniek. V R a T bunkách,

na rozdiel od S buniek, dochádza po 24 hodinovej inkubácii s bortezomibom pravdepodobne k obnove funkcie proteazómu.

PodĎakovanie: Tento príspevok vznikol vďaka podpore vedeckého grantu APVV- 15-0641.

Všetky cesty vedú ku stresu: vzájomná súhra tapsigargínu, tunikamycínu a imipramínu v procese indukcie stresu endoplazmatického retikula

Brodňanová Mária^{1,2}, Cibulka Michal^{1,2}, Pilchová Ivana², Račay Peter^{1,2}

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 03601 Martin, ²Martinské centrum pre biomedicínu, Divízia neurovedy, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 03601 Martin

Úvod: Stres endoplazmatického retikula (ERS) je jednou z príčin rozvoja neurodegeneratívnych, kardiovaskulárnych a metabolických ochorení. K vzniku ERS v bunke dochádza, keď sa v lúmene ER hromadia nezložené respektíve nesprávne zložené proteíny. Príčinami, ktoré k tomuto stavu vedú sú napríklad hypoxia, nedostatok glukózy alebo účinok chemických látok. K týmto patrí tapsigargín (TG), ktorý inhibuje Ca²⁺-ATPázu, pumpujúcu Ca²⁺ do ER. Ca²⁺ v ER je dôležité aj pri správnom zbalovaní proteínov. ERS vyvoláva aj tunikamycín (TM) blokujúci glykozyláciu polypeptidov. Bunke na ERS odpovedá spustením odpovede nezbalených proteínov (unfolded protein response, UPR), čím sa snaží obnoviť normálnu bunkovú homeostázu. UPR pozostáva z troch dráh. Na začiatku jednej z nich stojí IRE1 α (inositol requiring enzyme 1 α) – kináza s RNázovou doménou. Jej aktivitou dochádza k vyštiepeniu niekoľkých nukleotidov z mRNA pre XBP1 (X-box protein 1). Transkripciou takto upravenej mRNA vzniká funkčný transkripčný faktor, ktorý potencuje expresiu génov pre šaperóny a zložky ER-asociovej degradácie proteínov (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD). ERAD je jedným z mechanizmov, ktoré bunke pomáhajú adaptovať sa na ERS. Dôležitou súčasťou tejto dráhy je E3 ubikvitín ligáza – Hrd1, zúčastňujúca sa polyubikvitinácie polypeptidov. Takto označené sú potom polypeptidové reťazce degradované cytoplazmatickým proteazómom. Imipramín (IMI), ktorý je využívaný ako terapeutikum pre liečbu depresie, je schopný v rôznych experimentálnych modeloch spúšťať autofágiu alebo apoptózu.

Cieľ: Cieľom práce bolo sledovanie účinkov imipramínu na ERS vyvolaný vplyvom tapsigargínu alebo tunikamycínu v neuroblastómovej bunkovej línii SH-SY5Y.

Metódy: Zmeny v prežívaní buniek vplyvom použitých látok (800 nM TG, 2 μ M TM, 150/250 μ M IMI) boli kvantifikované použitím kolorimetrického MTT testu. Na sledovanie zmien v génovej expresii bola použitá reverzná transkriptázová PCR s následnou gélovou elektroforézou a western blot analýza.

Výsledky: Po ovplyvnení buniek IMI v kombinácii s TG/TM dochádza k výraznému poklesu prežívania v porovnaní s ovplyvňovaním buniek IMI, TG alebo TM samostatne. Analýza pomeru množstva zostrihutej a nezostrihutej mRNA transkripčného faktoru XBP1 ukazuje, že po 6h pôsobenia TG alebo TM dochádza k odpovedi na ERS spustením dráhy IRE1 α v ovplyvnených bunkách. Aktivita tejto dráhy UPR je ešte zosilnená po ovplyvnení buniek IMI v kombinácii s TG/TM. Po pôsobení TG/TM bola tiež pozorovaná zvýšená IRE1 α -závislá expresia génu pre Hrd1. V bunkách ovplyvnených TG/TM spolu s IMI je toto zvýšenie množstva Hrd1 potlačené.

Záver: Imipramín zosilňuje tapsigargínom a tunikamycínom vyvolaný stres ER. Účinkom IMI dochádza k zvýšenej aktivite IRE1 α dráhy spúšťanej TG/TM. Napriek tomu sa pôsobením IMI znižuje IRE1 α -závislá expresia génu pre Hrd1. Tento efekt

môže mať významnú úlohu na znížené prežívanie buniek vplyvom pôsobenia IMI spolu s TG alebo TM.

PodĎakovanie: Projekt bol podporený grantom VEGA 1/0277/18.

Antimikróbny potenciál syntetických derivátov alkaloidov

Tomáš Paqáč¹, Petra Olejníková¹, Peter Šafář², Ján Víglaš¹, Zuzana Ježíková¹,
Štefan Marchalín²

¹Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 81237 Bratislava, ²Oddelenie organickej chémie, Ústav organickej chémie katalýzy a petrochémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 81237 Bratislava

Alkaloidy predstavujú štruktúrne rôznorodú skupinu sekundárnych metabolitov so širokou škálou biologických účinkov. Rastlinné alkaloidy inhibujú glykozidázy a zasahujú do metabolizmu trehalózy. Zároveň majú schopnosť zhášať singletový kyslík, čím poskytujú rastlinám ochranu voči vedľajším toxickým produktom fotosyntézy. Napriek štruktúrnej rôznorodosti alkaloidy obsahujú atóm dusíka s voľným elektrónovým párom, vďaka čomu môžu, ľahko tvoriť vodíkové väzby s proteínmi, enzýmami a receptormi. Táto vlastnosť spolu s prítomnosťou vedľajších funkčných skupín (fenolické, hydroxylové atp.) vysvetľuje ich výnimočnú biologickú aktivitu.

Cieľom našej práce bolo stanoviť antimikrobiálny účinok synteticky pripravených derivátov indolizidínov a chinolizidínov. V prírode sa indolizidíny a chinolizidíny vyskytujú ako bioaktívne metabolity rastlín z čelade Leguminosace. Benzoindolizidíny syntetizované podľa predlohovej molekuly tyloforín mali najvyššiu inhibičnú aktivitu na *Staphylococcus aureus* a *Mycobacterium smegmatis* (MIC = 25 µg.ml⁻¹), no neinhibovali rast G⁻ baktérií a nemali významný účinok na kvasinky a vláknité huby. Deriváty tienochinolizidínov a benzochinolizidínov vychádzali z predlohovej štruktúry rastlinného alkaloidu kryptopleurínu resp. hydroxykryptopleurínu. Najcitlivejšou z modelových baktérií na tienochinolizidíny a benzochinolizidíny bola baktéria *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 12 µg.ml⁻¹) resp. *S. aureus* (MIC = 5 µg.ml⁻¹). Deriváty disponovali aj antifungálnou aktivitou inhibícia rastu sa zaznamenala pri *C. parapsilosis* (MIC₈₀ = 22 µg.ml⁻¹).

Účinné deriváty čiastočne inhibovali tvorbu bakteriálneho (*S. epidermidis*) aj kvasinkového (*C. parapsilosis*) biofilmu v podmienkach in vitro. Vo vzťahu antimikrobiálnej aktivity je rozhodujúca nasýtenosť základnej štruktúry, alkalický charakter heteroatómu resp. poloha síry v molekule. Dôležitým faktorom je zachovanie elektrónovej hustoty v oblasti alkalického heteroatómu dusíka. Tento dusík má voľný elektrónový pár, ktorý je dôležitý z hľadiska interakcie s proteínmi.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená výskumným projektom VEGA 1/0697/18.

Baktérie rezistentné voči antibiotikám prítomné v smoothie nápojoch a ich profil rezistencie

Krahulcová Monika¹, Lépesová Kristína¹, Micajová Barbora¹, Olejníková Petra¹,
Bírošová Lucia¹

¹FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Úvod: Trendy v stravovaní sa v súčasnosti stále viac zameriavajú na stravu bohatú na zeleninu a ovocie. Tento zdravý životný štýl zahŕňa napríklad aj v súčasnosti veľmi obľúbené smoothie nápoje, ktoré sú široko dostupné na trhu. Nápoje typu smoothie majú skutočne vysokú nutričnú hodnotu, avšak nakoľko ide o tepelne nespracovanú potravinu môžu práve v dôsledku surovosti produktu predstavovať zdroj rôznych mikroorganizmov. Správna výrobná prax a hygiena sú markery udávajúce mikrobiologickú záťaž nápojov pripravovaných v prechádzkach. Potraviny zároveň predstavujú vektor šírenia baktérií rezistentných voči antibiotikám v prostredí. V práci sme sa preto zamerali na sledovanie koliformných baktérií rezistentných voči antibiotikám vo vzorkách smoothie nápojov.

Metodika: Testované vzorky sme odobrali zo šiestich prevádzok v Bratislave a jednu sme pripravili priamo v laboratóriu. Ihneď po transporte do laboratória sme vzorky podrobili mikrobiologickej analýze, kde sme kultivačne pomocou Chromocult Coliform agaru stanovili počty rezistentných koliformných baktérií. Koncentrácie vybraných antibiotík zodpovedali hraniciam rezistencie podľa EUCAST. Rezistentné izoláty sme identifikovali pomocou hmotnostného spektrometra MALDI-TOF a následne sme určili profil rezistencie: citlivosť sme stanovili makrodilučnou metódou; nadprodukcii efluxných púmp sme detegovali agar Cartweelovej metódou s etídiom bromidom; prítomnosť génov rezistencie sme zisťovali pomocou multiplex PCR.

Výsledky: Všetky vzorky nápojov typu smoothie získané z prevádzok v Bratislave obsahovali koliformné baktérie rezistentné voči antibiotikám. V štyroch nápojoch však bola zaznamenaná len ampicilínová rezistencia, ktorá môže byť prirodzená. Identifikovali sme 106 rezistentných izolátov, kde prevažovali zástupcovia rodov *Enterobacter* (51%) a *Klebsiella* (28%). V prípade rodu *Klebsiella* sme zachytili aj kmeň *K. pneumoniae*, ktorý patrí medzi naproblematickejšie rezistentné kmene v nemocničnom prostredí a najčastejšie spôsobuje bronchopneumónie [1]. Prítomnosť tohto druhu baktérie v smoothie nápojoch môže predstavovať hrozbu pre zdravie človeka, nakoľko pracovník pripravujúci nápoj môže vdýchnuť bioaerosóly, ktoré vznikajú pri výrobe potraviny [2]. Multirezistenciu sme zaznamenali u 16% izolátov. Nadprodukcii efluxných púmp býva hlavnou príčinou viacnásobnej rezistencie a v našom prípade bola detegovaná u 19% rezistentných izolátov. β -laktámové antibiotiká sú najčastejšie používané antibakteriálne činidlá na liečbu infekčných ochorení u ľudí. Rezistencia voči týmto zlúčeninám je najčastejšie spojená s produkciou β -laktamáz [3]. U izolátov zo smoothie prevažovali gény rezistencie blaOXA, v menšej prevalencii blaSHV a blaTEM.

Záver: Baktérie rezistentné voči antibiotikám predstavujú globálnu hrozbu pre zdravie človeka. Potravinový reťazec môžeme považovať za vehikulum baktérií s týmto prívlastkom. Zvýšený dopyt po „zdravších“ a čo najmenej opracovaných potravinách, zvýšil spotrebu smoothie nápojov. Vzhľadom nato, že tento typ potraviny je pripravovaný zo surových ingrediencií je mikrobiota produktu veľmi bohatá a môže obsahovať aj patogénne a často rezistentné baktérie. V našej práci sme potvrdili prítomnosť rezistentných mikroorganizmov a preto je potrebné zlepšiť povedomie

verejnosti o možných rizikách vyplývajúcich z konzumácie nápojov typu smoothie a o nutnosti dodržiavania hygienických návykov v každom kroku prípravy.

Literatúra:

- [1] Goboová, M. Kuželová, M. 2013. Bakteriálna rezistencia z pohľadu klinického farmaceuta. In *Prakické lekárnictvo*, vol. 3, p. 49–50.
- [2] Bírošová, L. Sirotná, Z. 2018. Hodnotenie rizika mikrobiálnej kontaminácie – čerstvé ovocné a zeleninové šťavy, šaláty. Bratislava: MPSR. 29 s. ISBN 978-80-89738-17-5.
- [3] HENRIQUES, I. S., et al. 2006. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin. *Research in microbiology*, vol. 157, p. 938-947.

PodĎakovanie: Autori ďakujú za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre VEGA (1/0096/17), Výskumnej agentúre SR (ITMS 2623012006) a Agentúre pre výskum a vývoj (16-0171).

Revealing dynamic structural elements driving Renilla luciferase evolvability

Schenk Mayerova Andrea^{1,2}, Gaspar P. Pinto^{1,2}, Martin Toul^{1,2}, Martin Marek², Lenka Herychova³, Veronika Liskova^{1,2}, Daniel Pluskal², Stephane Emond⁴, Mark Dörr⁵, Joan Planas-Iglesias², Radka Chaloupkova², David Bednar^{1,2}, Zbynek Prokop^{1,2}, Uwe T Bornscheuer⁵, Florian Hofffelder⁴, Jiri Damborsky^{1,2}

¹International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, Pekarska 53, 656 91 Brno, Czech Republic, ²Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology and RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, Bld. A13, 625 00 Brno, Czech Republic, ³Regional Centre for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Zlutý kopec 7, 656 53 Brno, Czech Republic, ⁴Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, UK, ⁵Department of Biotechnology & Enzyme Catalysis, Institute of Biochemistry, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany

Recently, we have resurrected a bifunctional ancestral enzyme [1] that putatively existed prior to the functional diversification into structurally related modern-day haloalkane dehalogenases (EC 3.8.1.5) [2] and coelenterazine-converting Renilla luciferase (EC 1.13.12.5) [3]. This ancestor, which exhibited markedly enhanced thermal stability, was subjected to insertion-deletion mutagenesis to uncover molecular determinants important for the evolution of luciferase activity. The generated libraries were screened and the best hits were biochemically, kinetically and structurally characterized. One hit carrying an insertion and a substitution in the $\alpha 4$ helix of the cap domain was crystallized and its structure was solved to 2-Å-resolution by protein crystallography. There are two monomers present in the asymmetric unit. Although the overall structures of both monomers are very similar, they markedly differ in the positioning of the region of $\alpha 4$ helix where the insertion and substitution occurred. Moreover, electron density maps for the $\alpha 4$ helix and its flanking loops are not perfectly resolved, some side chains are poorly visible or not seen at all, which illustrates a conformational flexibility in this region. Complementary transient kinetics, hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry experiments and molecular dynamics simulations revealed that an outward movement of $\alpha 4$ helix and subsequent opening of the main access tunnel is necessary for the physical step of substrate binding and therefore acting on the ground-state in Renilla-type luciferases catalysis.

References:

1. Chaloupkova, R. et al. Light-emitting dehalogenases: Reconstruction of multifunctional biocatalysts. *ACS Catal.* 9, 4810–4823 (2019).
2. Koudelakova, T. et al. Haloalkane dehalogenases: Biotechnological applications. *Biotechnol. J.* 8, 32–45 (2013).
3. Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. & Cormier, M. J. Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4438–4442 (1991).

Metabolism and obesity studies in the model organism *Drosophila melanogaster*

Martina Gáliková^{1,2}, Peter Klepsatel¹, Heinrich Dircksen²

¹*Institute of Zoology SAS, Dúbravská cesta 9, 84506 Bratislava, Slovakia,*

²*Department of Zoology, Stockholm University, Svante Arrhenius väg 18b, SE-10691 Stockholm, Sweden*

Over the last several decades, metabolic complications have become a global epidemic (1). According to the World Health Organization, the prevalence of obesity has nearly tripled since 1975. Overweight and obesity shorten lifespan by increasing the risk of other health problems, such as metabolic syndrome, cardiovascular diseases and cancer. Identification and characterization of the genetic pathways that regulate energy metabolism has thus become a major challenge in biomedicine. Metabolic regulations have been broadly studied in mammals, but invertebrate models such as roundworm *Caenorhabditis elegans* and fruit fly *Drosophila melanogaster* have also immensely contributed to the understanding of energy balance (1). Thanks to its short lifespan, easy handling, and unprecedented transgenic tools that are available exclusively in this system, *Drosophila* has become the lead invertebrate model for the studies of obesity and energy balance. Importantly, the key metabolic pathways that regulate metabolism are highly evolutionarily conserved from invertebrates to humans. Many findings in *Drosophila* have hence a direct relevance for our understanding of human health. Flies are thus broadly used as models for various metabolic and diet-associated diseases including obesity and insulin resistance (1). In our lab, we are using *Drosophila* to study hormonal regulations of energy metabolism. We are especially interested in hormones that regulate glycaemia (i.e. stable levels of circulating sugars). In mammals, glycaemia is maintained by the action of insulin and its antagonist, glucagon. Whereas the insulin pathway is highly conserved from worms to humans, most invertebrates do not have a homolog of glucagon. Nevertheless, the evolutionary conservation of insulin advocates for existence of its antagonist in invertebrates as well. For a long time, Adipokinetic hormone (AKH) –a peptide studied for decades in numerous insect species– had been considered to be the insect analog of glucagon (1). This hormone increases glycaemia, but it had been enigmatic whether AKH hormone fulfills also other functions of glucagon. To address this question, I have created the first AKH-specific mutants in *Drosophila* (2). Analysis of the phenotypes of these mutants has shown that AKH fulfills only part of the functions of glucagon (2,3). In contrast to the glucagon receptor deficiency, deficiency for AKH or its receptor leads to obesity, low food intake, and only subtle changes in metabolic rate (3). Recently, we have discovered that AKH is a member of a novel, broader signaling pathway involving a hormone called Ion transport peptide (ITP). Our genetic gain- and loss-of-function experiments show that ITP is a novel hyperglycemic hormone with functions similar to those of glucagon. In addition, we show that ITP regulates secretion of AKH, but has also AKH-independent roles in processes governing development, reproduction, and lifespan. Altogether, our work

describes a novel hormonal axis, and identifies ITP as novel metabolic regulator with functions closely resembling those of mammalian glucagon (4).

References:

1. Gálíková M, Klepsatel P. Obesity and aging in the *Drosophila* model. *Int J Mol Sci* 2018; 19(7).
2. Gálíková M, Diesner M, Klepsatel P, et al. Energy homeostasis control in *Drosophila* Adipokinetic hormone mutants. *Genetics* 2015; 201(2): 665-83.
3. Gálíková M, Klepsatel P, Xu YJ, Kühnlein RP. The obesity-related Adipokinetic hormone controls feeding and expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism. *Eur J Lipid Sci Tech* 2017; 119(3).
4. Gálíková M, Klepsatel P, Dircksen H. In search of a fly glucagon. In preparation.

Acknowledgement: The work is supported by the Seal of Excellence funding from SAV (2019, Project acronym SteroidFLY).

Metabolomická analýza vplyvu onkometabolitov na bazálny metabolizmus ľudských neuroblastómových buniek

Gondáš Eduard¹, Baranovičová Eva², Bystrický Peter², Dobrota Dušan³, Murín Radovan¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK), ²Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine

Úvod: Nárast koncentrácie 2-hydroxyglutarátu (2-HG) v sére koreluje s neurologickým poškodením, ako aj s rozvojom niekoľkých typov nádorových ochorení. S cieľom identifikovať možný vplyv oboch enantiomérov (L- aj D-) 2-HG na bazálny metabolizmus ľudských neuroblastómových buniek: i) sme pomocou kombinácie vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s vysokorozlišovacou hmotnostnou spektrometriou (HRMS) kvantifikovali špecifické vychytávanie oboch enantiomérov 2-HG z kultivačného média; ii) využitím metódy protónovej nukleárnej magnetickej rezonancie (1H-NMR) sme kvalitatívne a kvantitatívne analyzovali metabolity v kultivačnom médiu.

Materiál a metódy: Ľudské neuroblastómové bunky (SH-SY5Y) boli rozdelené do troch skupín. Bunky prvej a druhej skupiny boli inkubované bez alebo v prítomnosti L-2-OHG, alebo D-2-OHG (0,1 mM), po dobu 24 hodín. Následne, kultivačné médiá boli v oboch prípadoch vymenené za čerstvé médiá obohatené o L-2-HG, alebo D-2-HG (0,1 mM). Tieto médiá boli po 24 hodinovej inkubácii podrobené metabolomickej analýze. Bunky tretej skupiny – kontrola, boli inkubované za rovnakých podmienok, ale bez pridania 2-HG.

Výsledky: Výsledky našej metabolickej analýzy poukazujú na to, že neuroblastómy metabolizujú glukózu, glutamín a pyruvát významným spôsobom. Tak isto neuroblastómy vo významnej miere vychytávajú aj leucín, izoleucín, valín a histidín. Vplyv onkometabolitov spomaľuje vychytávanie glukózy oproti kontrole so súčasným spomalením metabolizmu voľných esenciálnych rozvetvených aminokyselín. Pri vplyve 2-HG na neuroblastómy je syntéza alanínu zvýšená oproti kontrole. HPLC-HRMS analýza nám ukázala, že L-2-HG, ale aj D-2-HG sú vychytávané z kultivačného média neuroblastómovými bunkami a rýchlosť vychytávania súvisí s L alebo D formou 2-HG.

Záver: Nami získané výsledky sú v súlade s hypotézou, že glukóza je v nádorových bunkách metabolizovaná procesom anaeróbnej glykolýzy. Pri vplyve L a D formy 2-HG na neuroblastómové bunky bol metabolizmus glukózy a esenciálnych rozvetvených aminokyselín znížený oproti kontrole, čo môže korelovať s rozvojom neurologických poškodení alebo s rozvojom nádorových ochorení mozgu.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0088. Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR Zmluvy č. 2018/13-UKMT-9.

Vplyv nízkoteplotnej plazmy na vitalitu a sekundárny metabolizmus vláknitých húb

Lucia Hoppanová¹, Juliana Dylíková¹, Veronika Medvecká², Dušan Kováčik², Pavol Ďurina², Barbora Kaliňáková¹, Anna Zahoranová², Svetlana Kryštofová¹

¹Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko, ²Katedra experimentálnej fyziky, FMFI UK, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovensko

Vláknité huby sú producentmi rôznych sekundárnych metabolitov, medzi ktoré patria antibiotiká, pigmenty, mykotoxíny a pod. V prípade tvorby pigmentov a antibiotík predstavujú huby ekonomicky významný zdroj, keďže takáto produkcia je účinnejšia a výhodnejšia ako chemická syntéza. Tvorbou mykotoxínov spôsobujú ich fungálni producenti po kontaminácii rôznych poľnohospodárskych komodít obrovské ekonomické straty. V posledných rokoch sa venuje veľká pozornosť nízkoteplotnej plazme, ktorá je vhodným nástrojom nielen na dekontamináciu vláknitých húb/baktérií na povrchu rôznych matric, ale aj nástrojom, ktorý dokáže degradovať mykotoxíny.

V tejto práci sme sa zamerali na sledovanie účinku nízkoteplotnej plazmy generovanej difúznym koplánym povrchovým bariérovým výbojom, generovaným vo vzduchu za atmosférického tlaku, na vláknité huby rodov *Aspergillus* a *Trichoderma* a ich sekundárny metabolizmus. Sledovali sme najmä vplyv rôznych dávok nízkoteplotnej plazmy na vitalitu, kde sa nám potvrdil rýchly devitalizačný účinok plazmy na konídie vybraných vláknitých húb. Pomocou elektrónovej mikroskopie sme pozorovali zmeny povrchu konídií po aplikácií plazmy. Hoci bol pozorovaný účinok plazmy výrazný, bunky disponujú obrannými mechanizmami, ktoré sú zapájané v prípade aplikácie subletálnych dávok plazmy. U húb rodu *Aspergillus* sme zaznamenali signifikantne vyššie množstvo mykotoxínov produkovaných do média bunkami ošetrovanými plazmou v prvé dni kultivácie. Avšak v konečnom dôsledku bolo celkové množstvo stanovených mykotoxínov rovnaké, prípadne nižšie v porovnaní s neošetrovanými vzorkami.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-16-0216, APVV-16-0439 a Programom na podporu mladých výskumníkov STU.

Štúdium lokalizácie biosyntézy mykobakteriálneho galaktánu

Savková Karin¹, Mikušová Katarína¹

¹PRIF UK, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko

Tuberkulóza (TB), spôsobená patogénom *Mycobacterium tuberculosis*, patrí medzi 10 najčastejších príčin úmrtia na celom svete. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie v roku 2017 ochorelo na TB 10 miliónov ľudí a 1,6 milióna na ochorenie zomrelo, vrátane 0,3 milióna ľudí infikovaných vírusom HIV [1]. Hlavnou príčinou takejto vysokej morbidity a mortality spôsobenej *M. tuberculosis* je predovšetkým dlhé trvanie liečby a zvyšujúca sa rezistencia na všetky v súčasnosti používané antibiotiká v dôsledku nárastu multirezistentných (rezistencia na izoniazid a rifampicín), extrémne rezistentných (rezistencia na fluorochinolóny a amino-glykozidy) a úplne rezistentných (rezistencia voči všetkým známym liečivám) kmeňov. Jednou z charakteristických vlastností tuberkulózneho bacila je komplexná štruktúra bunkovej steny, ktorá je pre jeho životaschopnosť esenciálna a je hlavným terčom účinných liečiv proti tuberkulóze pôsobiacich na úrovni výstavby jej zložiek. V našej práci sa zaoberáme lokalizáciou syntézy polysacharidu galaktánu, ktorý je súčasťou kovalentného jadra bunkovej steny tvoreného peptidoglykánom, arabinogalaktánom a mykolovými kyselinami [2]. Zatiaľčo jednotlivé enzýmové kroky biosyntézy galaktánu sú relatívne dobre preskúmané, jej bunková lokalizácia zostáva doposiaľ neznáma. Nedávno boli v mykobaktériách definované dve funkčne odlišné membránové domény, ktoré sa líšia prítomnosťou špecifických enzýmov zapojených do syntézy vybraných zložiek bunkovej steny [3,4]. Naším cieľom bolo overiť prítomnosť metabolickej dráhy výstavby galaktánu v týchto doménach. Zistili sme, že pre efektívnu syntézu galaktánu je potrebná prítomnosť bunkových stien, hoci fluorescenne značená verzia kľúčového enzýmu pre polymerizáciu galaktánu, GlfT2, bola prednostne detegovaná vo frakcii čistých membrán, bez fragmentov bunkových stien [3,4]. Pretože lokalizácia enzýmu hrá dôležitú úlohu pri dostupnosti potenciálnych inhibítorov, veríme, že štúdium lokalizácie biosyntézy mykobakteriálneho galaktánu môže byť dôležitá aj z hľadiska identifikácie nových cieľov pre vývoj antituberkulotík.

Literatúra:

- [1] World Health Organization (2018). Global tuberculosis report 2018. World Health Organization.
- [2] Kaur, D., Guerin, M. E., Škovierová, H., Brennan, P. J., Jackson, M. (2009). Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in Applied Microbiology*, 69, 23-78.
- [3] Hayashi, J. M., Luo, C. Y., Mayfield, J. A., Hsu, T., Fukuda, T., Walfield, A. L., Madduri, A. (2016). Spatially distinct and metabolically active membrane domain in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 5400-5405.
- [4] Hayashi, J. M., Richardson, K., Melzer, E. S., Sandler, S. J., Aldridge, B. B., Siegrist, M. S., Morita, Y. S. (2018). Stress-induced reorganization of the mycobacterial membrane domain. *Molecular Microbiology*, 9, e01823-17.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantom APVV-15-0515 a UK/240/2019.

Sledovanie expresie génov pri nádorových procesoch gliálnych buniek

Majerčíková Zuzana¹, Richterová Romana², Račay Peter³, Galanda Miroslav⁴, Hatok Jozef¹

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Malá hora 4D, 03601 Martin, Slovensko,

²Neurochirurgická klinika UNM a JLF UK, Kollárova 2, 03601 Martin, Slovensko,

³Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine, Malá hora 4D, 03601 Martin, Slovensko,

⁴Neurochirurgická klinika SZU, FNsP F. D. Roosevelta, Nám. L. Svobodu 1, 97517 Banská Bystrica, Slovensko

Úvod: Mozgové nádory zahŕňajú širokú skupinu malignít s odlišným biologickým prejavom. Multiformný glioblastóm (GBM) patrí medzi najagresívnejšie nádory mozgu vyznačujúci sa vysokou biologickou variabilitou, obmedzenou odpoveďou na známe terapie a ešte horšou prognózou pre pacientov. Je preto nevyhnutné neustále pracovať na pochopení molekulárnej podstaty na transkripčnej úrovni, čo by mohlo viesť k personalizovanej liečbe a rozvoju nových terapeutík.

Materiál a metódy: Z archívnych vzoriek sme vytvorili dve hlavné skupiny: a) malígna glioblastómová (GBM, n = 20) a b) benígna meningiómová (MNG, n = 11). Kontrolnú skupinu tvorila komerčne dostupná RNA izolovaná z mixu zdravých mozgových buniek (CTRL, n = 3). cDNA získanú reverznou transkripciou izolovanej RNA sme použili na kvantitatívnu real-time PCR analýzu Array Human Cancer PathwayFinder™ v 96 jamkovom formáte. Pre každú vzorku sme stanovili expresiu 82 génov zapojených do 9 regulačných dráh (angiogenéza, apoptóza, bunkový cyklus i rast, poškodenie i oprava DNA, epiteliálno-mezenchymálny prechod, hypoxia, celkový metabolizmus a telomerázy).

Výsledky: Za významné zmeny v hladine expresie danej mRNA sme pri vzájomných koreláciách považovali hodnoty nad 2 (nadregulované) a pod -2 (podregulované). Pri porovnaní malígnych vzoriek s kontrolou sme detegovali 25% nadregulovaných a 42,7% podregulovaných génov so štatistickou významnosťou. Najvýraznejšie zmeny u glioblastómovej skupiny sme identifikovali u génov zúčastňujúcich sa proliferácie a celkového metabolizmu. Medzi malígnou a benígnou skupinou sme identifikovali významnú nadreguláciu génov ADM, CA9, CCL2, CDH2, IGFBP3, LPL, MKI67, SLC2A1 a SOX10. Výraznú podreguláciu sme zistili pri génoch DSP, FOXC2, PGF, SERPINF1 a TEK.

Záver: Výsledky poukázali na potrebu inhibície angiogenézy a migrácie nádorových buniek. Dôležitým výstupom bude korelácia získaných výsledkov s proteomickou analýzou, na základe ktorej by sme mohli vytvoriť ucelenú charakterizáciu glioblastómu a poukázať na nové terapeutické ciele.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0088 a APVV-0224-12.

Izolácia glukozinolátov z menej známych rastlinných druhov čeľade kapustovité

Polozsányi Zoltán¹, Galádová Helena¹, Šimkovič Martin¹

¹Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Glukozinoláty sú S-glukozidy syntetizované ako sekundárne metabolity rastlín čeľade kapustovité (napr. kapusta, brokolica, repka, horčica, žerucha). Ich enzymatickou hydrolýzou, pôsobením enzýmu myrozináza (β -tioglukozidhydroláza), v závislosti od podmienok prostredia (pH, prítomnosť Fe^{2+} iónov) vznikajú hlavne izotiokyanáty a vedľajšie produkty ako nitrily, epitiokyanáty, tiokyanáty, oxazolidín-2-dióny alebo indolylové zlúčeniny. Predpokladá sa, že aj niektoré druhy mikroorganizmov dokážu rozkladať glukozinoláty. Izotiokyanáty vykazujú zaujímavé chemoprotektívne účinky proti rôznym chronickým degeneratívnym ochoreniam vrátane rakoviny, kardiovaskulárnych ochorení, neurodegenerácie a cukrovky [1,2].

V popredí záujmu je izotiokyanát sulforafan, ktorého prekursorom je glukorafanín. Ukazuje sa, že má potenciálne ochranné účinky voči vzniku chorôb vyvolaných oxidačným stresom a chronickým zápalom. Sulforafan, ako aktivátor transkripčného faktora Nrf2, indukuje expresiu antioxidantných a detoxifikačných enzýmov II. fázy [3]. Sulfoxidová skupina na molekule glukorafanínu však môže podliehať oxidácii za vzniku derivátov ako glukoeryzolín a glukoerucín. Ich hydrolýzou vznikajú eryzolín a erucín, analógy sulforafanu s podobnou biologickou aktivitou [2].

Čeľaď kapustovité zahŕňa okrem hospodársky významných plodín aj voľne rastúce druhy napr. vesnovka obyčajná (*Cardaria draba*) alebo hľavník lekársky (*Sisymbrium officinale*). Sú k nim pripisované insekticídne, fungicídne a nematocídne vlastnosti práve vďaka obsahu glukozinolátov a ich degradačných produktov [1]. Vesnovka obyčajná je trváca rastlina rastúca prevažne na synantropných stanovištiach. Predstavuje potenciálny zdroj glukorafanínu. Náplňou práce je zdokonalenie izolácie intaktných glukozinolátov z rôznych nadzemných častí rastliny vesnovky obyčajnej a následná analýza obsahu glukorafanínu pomocou kvapalinovej chromatografie využívajúca hydrofilné interakcie (HILIC).

Literatúra:

- [1] Blažević I. (2014) Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential. *Austin J Bioorg & Org Chem.* 1(1): 4.
- [2] Angelino, D., & Jeffery, E. H. (2014). Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 67-76.
- [3] Russo M. et al. (2016) Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:8, 1391-140

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantom APVV-16-0439.

Štúdium rastlinných myrozináz prostredníctvom prírodných a syntetických glukozinolátov

Helena Galádová¹, Zoltán Polozsányi¹, Martin Šimkovič¹

¹Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlínskeho 9, 821 37, Bratislava

Myrozinázy sú hydrolytické enzýmy, ktoré patria do triedy tioglukozidglukohydroláz (EC 3.2.1.147). Sú bohato zastúpené v rastlinách z čeľade kapustovitých (*Brassicaceae*), napríklad v kapuste, brokolice, repke, horčici a mnohých ďalších. Najdôkladnejšie preštudované myrozinázy pochádzajú z *Arabidopsis thaliana*, v ktorej sa identifikovali 4 aktívne izoenzýmy (TGG1, TGG2, TGG4 a TGG5) a 2 pseudoenzýmy (TGG3 a TGG6) bez myrozinázovej aktivity a s nejasnou funkciou [1]. Iným rastlinným modelom je *Sinapis alba* (horčica biela), z ktorej sa podarilo pripraviť enzým v kryštalickej forme (MYR_SINAL SwissProt P29092) a čiastočne analyzovať jeho štruktúru [2]. Zistilo sa, že enzým sa vyskytuje prevažne vo forme homodiméru, ktorý je stabilizovaný Zn^{2+} kationom. V štruktúre sa nachádza vysoký počet soľných a vodíkových mostíkov, ďalej heptasacharidových reťazcov (obsahujúcich najmä manózoové jednotky), ktoré zvyšujú celkovú stabilitu enzýmu. Myrozinázy sa často asociujú s inými proteínmi, ktoré ovplyvňujú ich katalytické vlastnosti a zloženie vznikajúcich produktov. Mechanickým porušením rastlinných pletív sa myrozinázy dostávajú do kontaktu so svojimi substrátmi, glukozinolátmi, ktoré sa nachádzajú v iných bunkových kompartmentoch. Pôsobením myrozináz dochádza k hydrolýze glukozinolátov a tvorbe širokej škály produktov (nitrily, izotiokyanáty, epitionitrily a rôzne iné). Tieto produkty využívajú rastliny na vlastnú ochranu pred prežívavcami a fytopatogénmi [3]. Štúdium týchto látok ukázalo, že izotiokyanáty majú priaznivé účinky na ľudské zdravie. Najúčinnjším je sulforafan (jeho prekursorom je glukozinolát glukorafanín), ktorý blokuje karcinogézu prostredníctvom inhibície obranných detoxikačných enzýmov fázy I a indukcie enzýmov fázy II [4]. Vďaka týmto schopnostiam je v súčasnosti snaha zužitkovať glukozinolát-myrozinázový systém ako doplnok pri liečbe rôznych civilizačných ochorení. Táto práca pojednáva o izolácii rastlinnej myrozinázy zo semien žeruchy siatej (*Lepidium sativum*) s využitím rôznych chromatografických metód. Súčasťou štúdia je charakterizácia molekulových a katalytických vlastností enzýmu pomocou syntetického substrátu, sinigrínu, a prírodného preparátu izolovaného z rastliny *Cardaria draba*.

Literatúra:

- [1] Rask, L. a kol. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* 42(1):93-113.
- [2] Burnmeister, W.P. a kol. (1996) The crystal structure of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5: 663-675.
- [3] Halkier, A.B. a kol. (2006) Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Plant Biology* 57:303-333.
- [4] Russo M. a kol. (2016) Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(8): 1391-1405.

Podakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektu APVV-16-0439.

Štúdium biologického účinku neuropeptidov a ich receptorov u kliešťa *Ixodes ricinus*

Dominika Hromníková¹, Ivana Daubnerová¹, Ladislav Roller¹, Daniel Furka², Samuel Furka², Dušan Žitňan¹

¹Ústav zoológie SAV, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika; ²Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4

Kliešte radíme medzi článkonožce a obligátne ektoparazitické hematofágy. Tieto živočíchy patria medzi významné prenášače patogénov vírusu kliešťovej encefalitídy, baktérií z rodov *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, prípadne prvokov rodu *Babesia*. Kliešte z toho dôvodu radíme medzi veľmi významné modelové organizmy vzhľadom na ich závažný vplyv pri rozširovaní patogénov u hospodárskych zvierat a ľudí. Črevo a slinné žľazy kliešťov sú veľmi dôležité pre rozmnožovanie a prenos patogénov do krvi hostiteľa. Pri sledovaní expresie neuropeptidov a ich receptorov sme zistili, že špecifické neuropeptidy (alatotropín a alatostatín) a ich receptory sa vo zvýšenej miere produkujú v týchto orgánoch počas cicania kliešťov. Pre našu prácu sme využili molekulárne a bioinformatické metódy, vďaka ktorým sme zistili, že potlačením expresie týchto neuropeptidov pomocou RNAi dochádza u *I. ricinus* ku fyziologickým zmenám. Potlačením expresie alatotropínu a jeho receptora dochádza k miernemu predĺženiu cicania a výraznému zvýšeniu množstva nasatej krvi. Potlačením expresie alatostatínu a jeho receptorov sme pozorovali zvýšenie množstva nakladených vajčiek.

Literatúra

- Bednár, B., Roller, L., Čižmár, D., Mitrová, D., Žitňan, D. (2017). Developmental and sex-specific differences in expression of neuropeptides derived from allatotropin gene in the silkworm *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res.* 368:259-275.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., and Sonenshine, D. E. (2008). Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13, 6938–6946.
- Horodyski, F.M., Verlinden, H., Filkin, N., Vandersmissen, H.P., Fleury, C., Reynolds, S.E., Zheng-penkg Kai, Broeck, J.V. (2011). Isolation and functional characterization of an allatotropin receptor from *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 41:804–814
- Rizzoli, A. et al. (2014). *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front. Public Health* 2:251.

PodĎakovanie

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi RNDr. Dušanovi Žitňanovi, DrSc. za odbornú pomoc a za jeho ochotu vždy pomôcť. Táto práca bola podporovaná grantami APVV-14-0556, APVV-18-0201, VEGA-2/0080/18

Kryštalizácia mykobakteriálnej monooxygenázy EthA

Záhorszská Monika¹, Bellinzoni Marco², Korduláková Jana¹

¹Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, 842 15 Bratislava, Slovakia, ²Unité Microbiologie Structurale, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

Jedným z najzávažnejších infekčných ochorení súčasnosti je tuberkulóza. Tomuto ochoreniu, ktoré spôsobuje baktéria *Mycobacterium tuberculosis*, ročne podľahne 1,6 milióna ľudí na celom svete¹. Problémom liečby tuberkulózy je predovšetkým jej dĺžka, ktorá predstavuje minimálne šesť mesiacov a množstvo podávaných antituberkulotík, pričom nedodržovanie prísneho terapeutického režimu vedie k vývoju rezistentných foriem jej pôvodcu.

Veľké množstvo účinných antituberkulotík je podávaných vo forme neaktívnych pro-liečiv, ktoré pre svoju cytotoxickú aktivitu v mykobaktériách vyžadujú vnútrobunkovú aktiváciu. Jedným z takýchto antibiotík je etiónamid, ktorý je v mykobaktériách metabolizovaný na aktívne liečivo katalytickým pôsobením proteínu EthA². Mechanizmus účinku aktívneho etiónamidu spočíva v inhibícii enoyl-ACP reductázy InhA, dôležitej zložky FASII systému katalyzujúceho syntézu mykolových kyselín³. Zastavenie syntézy mykolátov vedie k narušeniu štruktúry bunkového obalu a následne k lýze buniek.

Proteín EthA je mykobakteriálna monooxygenáza, ktorá sa zúčastňuje aktivácie aj ďalších tioamidových a tiomočovínových antituberkulotík, ako sú napríklad protiónamid, tiacetazón alebo izoxyl^{4,5,6}. EthA sa zaraďuje do rodiny Baeyer-Villigerových monooxygenáz, ktoré pre svoju katalytickú funkciu vyžadujú kofaktory NADPH a FADH₂⁷. Úloha EthA v aktivácii uvedených liečiv je známa skoro 20 rokov, avšak štruktúra tohto proteínu dodnes nebola vyriešená. Aj keď viaceré práce naznačili, že v mykobaktériách proteín EthA zohráva úlohu v metabolizme dlhých mastných, tzv. mykolových kyselín⁸, poznatky o presnej fyziologickej funkcii tejto monooxygenázy stále chýbajú.

Cieľom našej práce bolo izolovať funkčnú monooxygenázu EthA s cieľom jej ďalšej biochemickej charakterizácie a vyriešenia jej štruktúry. Zamerali sme sa na produkciu viacerých ortológov tohto proteínu v rôznych kmeňoch *Escherichia coli*, respektíve ich (nad)produkciu v nepatogénnom environmentálnom kmeni *Mycobacterium smegmatis*. Opakovaným problémom počas izolácie EthA bolo zrážanie tohto proteínu, avšak optimalizáciou jednotlivých krokov sa nám podarilo úspešne izolovať aktívnu formu ortológu EthA z termofilnej mykobaktérie *Mycobacterium thermoresistibile*, ktorá štandardne prežíva pri 52 °C. Výsledkom prvých kryštalizačných experimentov boli mikrokryštály, v prípade ktorých sme nezaznamenali difrakciu, avšak ďalšou optimalizáciou podmienok sa nám podarilo získať proteínové kryštály s difrakciou pri rozlíšení ~ 6 Å.

Literatúra:

1. World Health Organization. (2018) Global Tuberculosis Report 2018.
2. DeBarber, A.E., et al. (2000) Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 9677–9682.
3. Quémard, A., Lanéelle, G., Lacave, Ch. (1992) Mycolic Acid Synthesis: a Target for Ethionamide in Mycobacteria? Ant. Agents and Chem. 36: 1316-1321.
4. Wang, F., et al. (2007) Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. J. Exp. Med. 204(1): 73-78.

5. Qian, L., Ortiz de Montenalto, P. R. (2006) Oxidative activation of thiacetazone by the Mycobacterium tuberculosis flavin monooxygenase EtaA and human FMO1 and FMO3. Chem. Res. Toxicol. 19(3), 443-449.
6. Korduláková, J., et al. (2007) Isoxyl Activation Is Required for Bacteriostatic Activity against Mycobacterium tuberculosis. Ant. Agents and Chem. 51, 3824–3829.
7. Fraaije, M. W., et al. (2004) The Prodrug Activator EtaA from Mycobacterium tuberculosis Is a Baeyer-Villiger Monooxygenase. J. Biol. Chem. 5, 3354-3360.
8. Ang, M. L. T., et al. (2014) An ethA-ethR-Deficient Mycobacterium bovis BCG Mutant Displays Increased Adherence to Mammalian Cells and Greater Persistence In Vivo, Which Correlate with Altered Mycolic Acid Composition. Infect. Immun. 82, 1850-1859.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0301/18.

Odpoveď *Neurospora crassa* na prítomnosť antifungálnych azolov – citlivosť a expresia vybraných génov

Ján Viglaš¹, Petra Olejníková²

¹*Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko*

Azolové antifungálne zlúčeniny predstavujú významné prostriedky v boji proti patogénom z ríše húb v klinickej praxi ako aj v poľnohospodárstve (proti fytopatogénom). Cieľovým miestom ich účinku je biosyntetická dráha ergosterolu, hlavného fungálneho sterolu, konkrétne enzým sterol-14- α -demetyláza, t.j. ERG11 (kvasinky) alebo jeho homológu CYP51 (vláknité huby) [1]. *Neurospora crassa* je vláknitá huba, ktorá má pomerne jednoduchú biosyntetickú dráhu ergosterolu s jedným homológom génu pre každý enzým biosyntetickej dráhy a preto predstavuje jeden z vhodných modelov na štúdium odpovede vláknitých húb na prítomnosť azolov.

Táto práca porovnáva odpoveď *N. crassa* wt "A" na štyri štruktúrne rôzne azolové antifungálne zlúčeniny: flukonazol, vorikonazol, prochloraz a ravukonazol. V práci sme sa zamerali na stanovenie citlivosti *N. crassa* na jednotlivé azoly a následne sme uskutočnili expresnú analýzu vybraných génov ergosterolovej dráhy (erg2, erg3, erg4, erg5, erg6, cyp51) a génov transportérov (cdr4, atrB, atrF, atrF2) rodiny G po expozícii vláknitej huby azolom.

Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že odpoveď *N. crassa* na jednotlivé azoly je rôzna. *N. crassa* je najviac citlivá na ravukonazol a vorikonazol (IC₅₀ = 0,2 μ g/ml a MIC₈₀ = 0,6 μ g/ml, resp. IC₅₀ = 0,1 μ g/ml a MIC₈₀ = 0,3 μ g/ml), najnižšiu citlivosť sme zaznamenali na flukonazol (IC₅₀ = 9 μ g/ml a MIC₈₀ = 15 μ g/ml). Rozdielne výsledky citlivosti by mohli byť odôvodnené rozdielnou schopnosťou enzýmu ERG11/CYP51 interagovať s postranným reťazcom azolu, ktorý ukotvuje azol v aktívnom centre enzýmu [2]. Expresia génu erg5 a cyp51 sa v prítomnosti azolov v porovnaní s kontrolou porovnateľne znížila. Najmarkantnejší rozdiel sme zaznamenali po expozícii *N. crassa* na vorikonazol, kde bola v porovnaní s kontrolou znížená expresia génov erg2, erg3, erg4. Expresia génu erg6 bola najviac znížená v prítomnosti prochlorazu. Prítomnosť vorikonazolu mierne zvýšila expresiu génov pre efluxné pumpu cdr4, atrB a atrF2. Podobný efekt sa zaznamenal v prítomnosti ravukonazolu na expresiu génu atrB. Na záver môžeme konštatovať, že odpoveď génov vláknitej huby *N. crassa* nie je voči rôznym štruktúram azolov rovnaká, a preto bude potrebné jednotlivé odpovede bližšie študovať za účelom pochopenia prečo sú niektoré vláknité huby citlivé na azoly, resp. prečo si niektoré ľahko dokážu vyvinúť rezistenciu voči azolom.

Literatúra:

- [1] Chengcheng H, Zhou M, Wang W et al., Abnormal Ergosterol Biosynthesis Activates Transcriptional Responses to Antifungal Azoles, *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:9
- [2] Monk BC, Tomasiak TM, Keniya MV, et al., Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(10):3865-70

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0697/18 a grantovou schémou STU pre mladých výskumných pracovníkov.

Afinitná imobilizácia enzýmov

Michal Piž¹, Martin Rebroš¹

¹*Ústav biotechnológie, FChPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava*

Aby bolo použitie biokatalyzátorov (hlavne enzýmov) ekonomicky výhodné, je vhodné aby bol enzým použitý viackrát bez značnej straty aktivity. Riešením tohto problému je technika známa ako imobilizácia. Imobilizácia je definovaná ako metóda používaná pre fyzickú alebo chemickú fixáciu buniek, organel, enzýmov alebo proteínov na pevný povrch, do tuhej matrice alebo zachytenie do membrány [1]. Imobilizáciou možno dosiahnuť zvýšenie stability daného biokatalyzátora a taktiež jeho opakované využitie. Medzi benefity imobilizácie patrí jednoduchá separácia biokatalyzátora, ochrana pred nepriaznivými vplyvmi prostredia, vyššie výťažky a lepšia operačná stabilita. Avšak aj imobilizácia má svoje nevýhody, ktorými môžu byť cena imobilizačnej matrice, difúzne limitácie a inaktivácia biokatalyzátora počas procesu imobilizácie [2]. V posledných desaťročiach bolo vyvinutých množstvo imobilizačných techník, ktoré možno na základe interakcie medzi biokatalyzátorom a nosičom rozdeliť do troch skupín: a) uchytenie na povrch nosiča (adsorbcia, kovalentné naviazanie), b) zachytenie do štruktúry nosiča (entrapment, enkapsulácia), c) zosieťovanie (cross-linking) [3]. História afinitnej imobilizácie (IMAC) siaha do roku 1975, kedy bola prvý krát pozorovaná interakcia iónov Zn^{2+} a Cu^{2+} s imidazolovými a tiolovými skupinami na povrchu proteínu (transferín, α -antitrypsín, γ -globulín). Princípom interakcie je afinita iónov prechodných kovov ($Zn(II)$; $Cu(II)$; $Ni(II)$; $Co(II)$) k cysteínu, histidínu a tryptofánu vo vodných roztokoch [4]. V tejto práci boli afinitne imobilizované rekombinantné enzýmy, ktoré boli produkované pomocou *E. coli*. Bola sledovaná aktivita daných enzýmov, stanovené optimálne reakčné a imobilizačné podmienky, ako aj a dlhodobá stabilita enzýmov.

Literatúra:

1. IUPAC: Compendium of chemical terminology-goldbook; 2014.
2. Jahnz U, Wittlich P, Prüsse U, Vorlop K-D: New Matrices and Bioencapsulation Processes. In: Engineering and Manufacturing for Biotechnology. Edited by Hofman M, Thonart P. Dordrecht: Springer Netherlands; 2002: 293-307.
3. Sheldon RA, van Pelt S: Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Society reviews 2013, 42(15):6223-6235.
4. Cheung RCF, Wong JH, Ng TB: Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. Applied microbiology and biotechnology 2012, 96(6):1411-1420.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore projektu VEGA 2/0090/16.

Scale up produkcie rekombinantných enzýmov z glycerolu

Krasňan Vladimír¹, Rebroš Martin²

¹Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

V súčasnej dobe má produkcia enzýmov pevné postavenie v rôznych odvetviach priemyslu. Zároveň prevláda nárast ich využitia z dôvodov ako ekonomických tak aj environmentálnych. Výraznejšie presadenie enzýmov umožnila ich produkcia rekombinantnými mikroorganizmami, pričom ide o ľahko kultivovateľné a ekonomicky nenáročne druhy do ktorých je genetickými metódami vložený gén a následná expresia daného enzýmu. V prípade priemyselného využitia takýchto mikroorganizmov ich zostrojenie predstavuje len prvú fázu výskumu. Veľmi podstatná je aj následná veľkokapacitná produkcia mikroorganizmu v priemyselných objemoch, s dostatočnou expresiou žiadaného proteínu v snahe docieľiť ekonomickú rentabilitu a nízku ekologickú záťaž [1,2]. V prípade rekombinantov *E. coli* a *P. pastoris*, využívaných v našom tíme, je najlepšou cestou fermentácia s vysokými bunkovými hustotami (HCDC), kde možno dosiahnuť aj viac ako 100 g/L suchých buniek [3, 4]. Úspešný príklad predstavuje HCDC príprava rekombinantnej glukóza dehydrogenázy (GDH), kde koncentrácia buniek dosiahla 15 násobné zvýšenie oproti baničkovým kultiváciám pri zachovaní rovnakej špecifickej aktivity enzýmu. Zároveň bol proces postupne optimalizovaný na objemy 0,15; 1,5; 7 a 10 litrov a vykonávaný na bioreaktoroch konštrukčne zhodnými s priemyselnými zariadeniami.

Výrazným ekologickým benefitom uvedenej fermentácie je aj využitie glycerolu ako hlavného zdroja uhlíka, ktorý predstavuje odpad pri výrobe bionafty. Hlavnú nevýhodu aplikácie predstavujú nečistoty obsiahnuté z výrobného procesu, obmedzujúce jeho využitie v iných odvetviach priemyslu. O to viac sa zvyšuje atraktivnosť použitia odpadových glycerolov v biotechnológií. V našom prípade bolo niekoľko typov takýchto substrátov úspešne využitých na produkciu priemyselne významných látok ako butanol, 1,3 propándiol a kyselina maslová [5, 6, 7].

V súčasnosti je hlavnou výzvou na základe získaných skúseností spojiť obe metódy a tým produkovať rekombinantné enzýmy s vysokou hodnotou za použitia lacného odpadového glycerolu.

Literatúra:

1. Gomes, L.C.; Mergulhão, F.J. Heterologous protein production in escherichia coli biofilms: A non-conventional form of high cell density cultivation. *Process Biochemistry* 2017, 57, 1-8.
2. Mergulhão, F.J.; Summers, D.K.; Monteiro, G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 2005, 23, 177-202.
3. Lee, S.Y. High cell-density culture of *escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 1996, 14, 98-105.
4. Liu, W-C.; Gong, T.; Wang, Q-H.; Chen, J-J.; Zhu P. Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Sci Rep* 2016, 6, 18439-18451.
5. Krasňan, V.; Piž, M.; Marr, A. C.; Markošová, K.; Rosenberg, M.; Rebroš, M. Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Eng J* 2018, 134.
6. Dolejš, I.; Líšková, M.; Krasňan, V.; Markošová, K.; Rosenberg, M.; Lorenzini, F.; Marr, A.C.; Rebroš, M. Production of 1,3-Propanediol from Pure and Crude Glycerol Using Immobilized *Clostridium butyricum*. *Catalysts* 2019, 9(4), 317-330.

7. Rebroš, M.; Dolejš, I.; Stloukal, R.; Rosenberg, M. Butyric acid production with *Clostridium tyrobutyricum* immobilised to PVA gel. *Process Biochem* 2016, 51(6), 704-708.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0254.

Konštrukcia nanoštrukturovaného biosenzora na detekciu potenciálneho biomarkera rakoviny prostaty – sarkozínu

Štefánia Hrončeková¹, Tomáš Bertók¹, Ján Tkáč¹

¹*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika*

Rakovina prostaty je jednou z najčastejších príčin úmrtia na rakovinu u mužov vo väčšine oblastí sveta. Ročný počet úmrtí na rakovinu prostaty sa každým rokom zvyšuje. Odhalenie ochorenia v jeho počiatocnom štádiu dokáže výrazne zvýšiť šancu na prežitie pacienta [1]. V diagnostike karcinómu prostaty sa už roky ako zlatý štandard používa prostatický špecifický antigén, skrátene PSA. Je to bielkovina, ktorú tvoria žľazové bunky nielen v tkanivách prostaty postihnutej rakovinou ale aj zdravej prostaty, prostaty postihnutej zápalom či benígnou prostatickou hyperpláziou [2]. Keďže špecificita PSA na rakovinu prostaty je nízka, snahou je hľadať nové špecifickejšie biomarkery. Ich vhodná kombinácia dokáže zvýšiť šancu na včasné odhalenie ochorenia. V tejto práci sme sa zamerali na aminokyselinu sarkozín, medziprodukt metabolizmu glycínu, ktorého hladiny v moči aj v krvi sú pri rakovine prostaty zvýšené [3].

Sarkozín bol detegovaný elektrochemicky v trojelektrodovom systéme v potenciálovom rozsahu +0,1 V až -1,0 V pomocou enzýmu sarkozín oxidáza (EC 1.5.3.1). Tento flavoenzým patrí do skupiny oxidoreduktáz. Vo vodnom prostredí dokáže oxidatívne demetylovať sarkozín pričom vznikajú glycín, formaldehyd a peroxid vodíka, ktorý je možné elektrochemicky stanoviť. Enzým bol imobilizovaný na elektródach zo sklovitého uhlíka GCE s vopred upraveným povrchom obsahujúcim MXén - nový 2D nanomateriál a chitosan. V rámci práce sme analyzovali správanie pripravených elektród s naviazanou vrstvou MXén+chitosan/SOx resp. MXén+chitosan/GA/SOx v prostredí fosfátového pufru v prítomnosti rôznych koncentrácií sarkozínu. Okrem elektrochemickej analýzy bola vykonaná aj skenovacia elektrónová mikroskopia a mikroskopia atomárnych síl. Výsledky práce poukazujú na možnosť použitia pripraveného biosenzora na detekciu sarkozínu v moči pacientov, ktorý by mohol byť využitý pri včasnej diagnostike rakoviny prostaty.

Literatúra:

- [1] Tkáč J. et al.; Prostate-specific antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer, *Interface Focus*, 2019, Vol. 9, -
- [2] Damborská D. et al.; Nanomaterial-based biosensors for detection of prostate specific antigen, *Microchimica Acta*, 2017, Vol. 184, p. 3049-3067
- [3] Rebelo S.C.R.T. et al.; Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples, *Analytica Chimica Acta*, 2014, Vol. 850, p. 26-32

Pod'akovanie: Táto práca je výsledkom realizácie projektu VEGA 2/0137/18 a 2/0090/16, a APVV 17-0300. Radi by sme poďakovali podpore z ERC Proof of Concept grant (No. 825586).

Nový pohľad na známe biomarkery – potenciál skorej diagnostiky rakoviny semenníkov

Híreš Michal¹, Jáné Eduard¹, Mego Michal², Chovanec Michal³, Kasák Peter⁴, Tkáč Ján¹

¹Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovensko, ²II. Onkologická klinika LFUK a NOÚ, Bratislava, Slovensko, ³Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ, Bratislava, Slovensko, ⁴Center for Advanced Materials, Qatar University, Doha 2713, Qatar

Rakovina semenníkov patrí medzi najčastejšie solidné nádory mužov medzi 15 až 35 rokom života¹. Za posledné desaťročia má výrazne rastúci trend výskytu¹. Presné príčiny vzniku nie sú známe, popísané sú len niektoré faktory, ktoré majú pozitívnu koreláciu². Preto ťažiskom je skorá a spoľahlivá diagnostika. V súčasnosti používané zobrazovacie techniky dokážu detegovať len väčšie útvary často už v pokročilých štádiách. Alternatívou je stanovenie koncentrácie dnes akceptovaných biomarkrov (ľudského choriového gonadotropínu – hCG, α -fetoproteínu – AFP a lektátdehydrogenázy – LDH) v krvi alebo moči. Tento prístup je ale nedostatočne spoľahlivý alebo málo špecifický³. Riešením sa javí sledovať zmenu glykozylácie vybraných proteínov, čo naznačuje aj literatúra, že malá kvalitatívna alebo kvantitatívna zmena glykánov je spojená s veľkým rozdielom v biologických účinkoch. Za týmto účelom sa vyvíja diagnostická metóda, ktorá by bola schopná na základe sledovania glykánov spoľahlivo diagnostikovať rakovinu semenníkov. V pilotných experimentoch sme sa zamerali na sledovanie interakcií biomolekúl technikou rezonancie povrchových plazmónov. Pozornosť sa upriamila na jeden zo súčasných biomarkerov, na hCG, ako na potenciálny glykoproteín, ktorého zmeny v glykozylácii by mohli predikovať ochorenie. Tri rôzne formy hCG sa imobilizovali v prostredí 10 mM octanového tlmivého roztoku s pH 5,0 na príslušné CM5 čipy. Následne sa testovali tri protilátky pre rôzne epitopy a vybrali sa tie s najlepšou väzbou na proteín. V ďalšom kroku sa stanovili interakčné konštanty pre lektíny AAL, MAL-II, PHA a SNA pri väzbe na príslušné imobilizované molekuly hCG. Najväčšiu odozvu sme zaznamenali pri lektíne MALII.

Literatúra:

1. Cheng, L. et al. Testicular cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 29 (2018).
2. Mucci, L. A. et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA* 315, 68 (2016).
3. Favilla, V., Cimino, S., Madonia, M. & Morgia, G. New advances in clinical biomarkers in testis cancer. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 2, 456–77 (2010).

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená VEGA grantmi 2/0137/18 a 2/0090/16, grantom APVV-17-0300 a grantom MZ SR 2018/23-SAV-1.

Využitie rekombinantných oxidoreduktáz na produkciu chirálnych sekundárnych alkoholov

Tatiana Petrovičová¹, Martin Rebroš¹

¹Ústav biotechnológie, FChPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava

Príprava rekombinantných proteínov vo veľkom množstve umožňuje ich dôkladnejšiu biochemickú charakterizáciu, využitie v priemyselných procesoch a príprave komerčných preparátov. Medzi najpoužívanejšie hostiteľské kmene patrí *Escherichia coli* kvôli mnohým výhodám, ktoré tento mikroorganizmus poskytuje, či už rýchly rast, schopnosť nárastu do vysokých bunkových hustôt či jednoduchú indukciu a expresiu žiadaného génu. Počas produkcie proteínov v praxi môže vzniknúť mnoho problémov, ktoré je možné odstrániť optimalizáciou jednotlivých krokov od klonovania génu až po „downstream“ procesy [1]. Enzýmy sú schopné katalyzovať reakcie pri miernych podmienkach (pH, teplota, tlak) s vysokou chemo-, regio- a stereoselektivitou. Práve tieto vlastnosti sú čoraz viac využívané aj v organickej syntéze na prípravu chirálnych látok, kde nahrádzajú klasické chemické postupy. V biokatalýze zastávajú svoju úlohu celobunkové systémy ako aj izolované enzýmy, pričom obidva prístupy majú svoje výhody aj nevýhody [2]. Opticky aktívne sekundárne alkoholy sú dôležité medziprodukty organických syntéz. Pripravujú sa redukciami ketónov, či už chemicky alebo pomocou rôznych alkoholdehydrogenáz, medzi ktoré patria aj ketoreduktázy. Tie vyžadujú prítomnosť nákladných kofaktorov, preto je dôležité mať vhodný regeneračný systém, ktorým sa znížia náklady procesu [3]. V našej práci boli skúmané ketoreduktáza a alkoholdehydrogenáza, ktoré boli úspešne rekombinantne naprodukované pomocou kmeňa *Escherichia coli* BL21(DE3). Po optimalizácii produkcie a „downstream“ procesoch boli enzýmy charakterizované a aplikované na redukciiu ketónov rôznych štruktúr. Na regeneráciu NADPH kofaktora bola použitá glukózadehydrogenáza, ktorá bola spolu s ketoreduktázou úspešne koimobilizovaná entrapment technológiou do PVA gélu na dosiahnutie vyššej stability a opätovného využitia enzýmov v biokatalytickom procese [4].

Literatúra:

1. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 2014. 5: p. 172-172.
2. Goldberg, K., et al., Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007. 76(2): p. 237.
3. Huisman, G.W., J. Liang, and A. Krebber, Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Curr Opin Chem Biol*, 2010. 14(2): p. 122-9.
4. Petrovičová, T., et al., Co-Immobilization of Ketoreductase and Glucose Dehydrogenase. *Catalysts*, 2018. 8(4).

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-16-0314.

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
Postery

Účinok hypericínu v hypoxii so zameraním na nádorové kmeňové bunky a rezistenciu voči terapii

Viktória Buľková¹, Jana Vargová¹, Rastislav Jendželovský¹, Peter Fedoročko¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Šrobárova 2, 041 54 Košice, Slovensko

Prítomnosť intratumorových hypoxických oblastí predstavuje jeden z hlavných dôvodov zlyhania onkoterapie. Hypoxia, typická črta nádorového mikroprostredia, je spájaná s udržiavaním fenotypu nádorových kmeňových buniek (angl. cancer stem-like cells, CSCs), a tým je nepriamo zodpovedná aj za progresiu a rekurenciu nádorového ochorenia. CSCs možno detegovať metódou "side-population" (SP) založenou na zvýšenej efluxnej aktivite ABC transportných proteínov, a to hlavne BCRP a P-gp. Prítomnosť SP populácie v nádorovom tkanive je tak potenciálnym indikátorom jeho rezistencie, čo predstavuje vážnu prekážku k dosiahnutiu efektívnej terapie. Hypericín (HY), prírodná látka syntetizovaná rastlinami rodu *Hypericum*, môže zohrávať úlohu v modulácii rezistencie nádorových buniek voči terapii (zhrnuté v [1]). HY je substrátom a potenciálnym kompetitívnym inhibítorom BCRP [2,3]. Cieľom našej práce bolo zistiť, či HY v hypoxických podmienkach dokáže znížiť veľkosť SP populácie, čím by mohol pozitívne ovplyvniť senzitivitu nádoru k simultánnej aplikovanej terapii, alebo naopak, hypoxia bude stimulovať eflux HY, a tým zamedzí jeho želanému účinku. Naše doterajšie výsledky poukazujú na to, že aj napriek miernemu poklesu intracelulárneho obsahu HY v nádorových bunkách vplyvom hypoxie, HY a hypoxia znížili veľkosť rezistentnejšej SP populácie. HY navyše čiastočne inhiboval zvýšenú klonogénnu schopnosť SP buniek získanú hypoxickými podmienkami. Keďže za znížením veľkosti SP vplyvom HY v normoxii stojí kompetitívna inhibícia BCRP [3] a tento efekt bol dokonca zosilnený účinkom hypoxie, naše výsledky naznačujú, že HY by mohol uvedeným mechanizmom napomôcť pri zvyšovaní účinnosti určitých typov chemoterapeutík aj v hypoxických podmienkach. Tento záver je však potrebné overiť aj kombináciou HY s konkrétnymi, klinicky využívanými, chemoterapeutikami.

Literatúra:

- [1] Jendželovská a kol., 2016: Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin, *Front. Plant Sci.* 7:560
- [2] Jendželovský a kol., 2019: Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation and toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy, *Biomed Pharmacother* 109, 2173-2181
- [3] Vargová a kol., 2018: Hypericin affects cancer side populations via competitive inhibition of BCRP, *Biomed Pharmacother* 99, 511-522

PodĎakovanie: Táto práca vznikla za podpory Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR v rámci plnenia projektu VEGA 1/0022/19.

Protoapigenón a jeho 1'-O- butyl derivát ako perspektívne látky v liečbe melanómu

Csekes Erika¹, Hunyadi Attila², Lucia Račková¹

¹Centrum experimentálnej medicíny, o. z. Ústav experimentálnej farmakológie SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovensko, ²Inštitút Farmakognózie, Farmakologická fakulta, Univerzita v Szegede, Eotvos u. 6, 6720 Szeged, Maďarsko

Flavonoidy - sekundárne metabolity rastlín - sú v posledných rokoch predmetom veľkého záujmu kvôli svojim preventívnym účinkom voči rôznym chronickým ochoreniam, malígne ochorenia nevynímajúc. Navyše stále viac štúdií dokazuje ich cytotoxické účinky voči nádorovým bunkám. Skúmanie flavonoidov sa preto ukazuje byť nádejnou cestou vo výskume protinádorových látok a v konečnom dôsledku v liečbe nádorových ochorení.

Protoapigenón, prírodný flavonoid prvýkrát izolovaný z paprade *Thelypteris torresiana*, je z hľadiska štruktúry aj syntézy podobný apigenínu - flavonoidu s už známym protinádorovým účinkom. Protoapigenón vykazuje v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach 10-krát silnejšiu protinádorovú aktivitu ako samotný apigenín znižuje životaschopnosť nádorových buniek, spôsobuje poškodenie DNA, indukuje zástavu bunkového cyklu, zvyšuje tvorbu voľných radikálov [1]. Vzhľadom na vysoké cytotoxické účinky protoapigenónu voči nádorovým bunkám sa v súčasnosti kladie dôraz na syntézu jeho nových derivátov. Protoapigenón-1'-O-butyl éter sa ukazuje v *in vitro* podmienkach ako najúčinnější spomedzi všetkých derivátov, znižuje viabilitu nádorových buniek pečene, prsníka a pľúc [2].

Cieľom našej práce bolo preskúmanie protinádorového potenciálu protoapigenónu (PA) a jeho 1'-O- butyl derivátu (PABu) v ľudskej melanómnej línii A375.

Protoapigenón a jeho 1'-O-butyl derivát znížili životaschopnosť melanómových buniek už v submikromolárnych koncentráciách, pričom butylovaný derivát ukázal v porovnaní s PA mierne toxickejší účinok. Fluorescenčným farbením sme dokázali, že PA aj PABu indukovali nárast veľkosti, zníženie proliferácie a apoptickú smrť nádorových buniek. Prietokovou cytometriou sme zistili zvýšenú tvorbu voľných radikálov v ovplyvnených nádorových bunkách, čo naznačuje indukované zmeny v redoxnej homeostáze. Analýza bunkového cyklu pomocou fluorescenčného farbenia DNA a prietokovej cytometrie ukázala, že testované látky indukujú akumuláciu buniek v G2/M fáze.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že protoapigenón a jeho 1'-O-butyl derivát, ako potenciálne látky v liečbe melanómu, sú vhodnými kandidátmi pre ďalšie testovanie protinádorového účinku.

Literatúra:

[1] Chen, W. Y. et al. Protoapigenone, a natural derivative of apigenin, induces mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in human breast cancer cells associated with induction of oxidative stress and inhibition of glutathione S-transferase Π . *Invest. New Drugs* 29, 1347–1359 (2011).

[2] Hunyadi, A. et al. Direct semi-synthesis of the anticancer lead-drug protoapigenone from apigenin, and synthesis of further new cytotoxic Protoflavone derivatives. PLoS One 6, 1–10 (2011).

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantami: VEGA 2/0041/17 a COST Action CM1407. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0336

Morfologická a morfometrická analýza ventrálneho kaudálneho nervu potkana

Dzurjašková Zuzana¹, Blaško Juraj¹, Vanický Ivo¹

¹*Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovensko*

Ventrálny kaudálny nerv patrí medzi najdlhšie periférne nervy v tele potkana. Z tohto dôvodu sa stal hlavným predmetom našej štúdie regeneračných procesov na dlhé vzdialenosti. Detailná znalosť jeho morfológie vedie k potrebným výsledkom v kvantitatívnom vyhodnotení úspešnosti, či zlyhania regenerácie po predošlej experimentálnej transekcii s následným prepojením proximálneho a distálneho kýpťa poškodeného nervu. Táto štúdia preto popisuje dôležité morfologické a niektoré morfometrické parametre ventrálneho kaudálneho nervu u potkanov kmeňa Wistar albino. Dvanástim dospelým jedincom samčieho pohlavia (≥ 250 g) bol v inhalačnej anestéze za aseptických podmienok urobený laterálny kožný rez na úrovni 2 cm pod bázou chvosta. S pomocou operačného mikroskopu bol nájdený a uvoľnený ventrálny chvostový nerv, a na základe skeletopickej pozície bola v oblasti chvostového stavca Ca6 vyizolovaná proximálna časť intaktného nervu v dĺžke 11 až 13 cm. Následne bolo tkanivo imerzne zafixované v 2,5% roztoku glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovom pufrí. Celá vzorka bola zaliata do proteínovej matrix (albumín – želatínová zmes), ktorá fixuje vzorku vo vystretom stave a umožňuje precízne nakrájanie 1 mm hrubých priečných rezov. Vzorky s nervovým tkanivom boli postfixované v 1% oxide osmičelom, dehydrované vo vzostupnej alkoholovej rade a zaliata v epoxidovej živici Durcupan. V rostrokaudálnom priebehu nervu bola každých 10 mm zozbieraná séria dát a 1 μ m hrubé transverzálne rezy boli pripravené pre ďalšiu morfometrickú analýzu. Pri vyhodnocovaní celkového počtu myelinizovaných axónov bol použitý software NeuroCounter, ktorý rozpoznáva kontúry axónov podľa automatickej detekcie. Hodnoty G-ratia boli vyhodnotené v programe ImageJ ako priemer vonkajšej a vnútornej plochy axónu. Naše výsledky morfologickej a morfometrickej analýzy ventrálneho kaudálneho nervu potkana prinášajú cenné informácie a poznatky, vďaka ktorým sa ventrálny kaudálny nerv preukázal ako vhodný model nie len pre mikrochirurgické výkony, ale aj ako model pre potreby v ďalších experimentoch v oblasti regeneračnej medicíny.

PodĎakovanie: Práca bola finančne podporená grantami APVV 14-0847, VEGA 2/0040/19 a APVV 15-0655.

Testovanie inhibičného účinku komerčných antifungálnych látok na transglykozylázy Crh1, Crh2, Phr1 a Phr2

Ágnes Horváthová¹, Natália Čurillová², Barbora Stratilová³, Vladimír Farkaš¹, Eva Stratilová¹

¹Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko, ²Vysoké učení technické v Brne, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika, ³Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej, výpočtovej a teoretickej chémie, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

Bunková stena je významnou štruktúrou fungálnych buniek. Ide o pevnú štruktúru, ktorá musí počas bunkového rastu a vývinu expandovať a prispôsobovať sa podmienkam a aktuálnym situáciám, v ktorých sa bunky nachádzajú. Tieto procesy zabezpečujú transglykozylázy, ktoré štiepia polyméry bunkových stien, ale na rozdiel od typických endohydroláz neprenášajú fragmenty s pôvodným neredukujúcim koncom na vodu, ale na iný poly- alebo oligosacharid (1-3). Medzi najlepšie preštudované kvasinkové transglykozylázy patria Crh1 a Crh2 *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sú členmi rodiny GH16 (4) a Phr1 a Phr2 *Candida albicans*, ktoré patria do rodiny GH72 (5). Náplňou našej práce bolo otestovať potencionálny inhibičný účinok komerčných inhibítorov na tieto enzýmy s cieľom nájsť inhibítory, ktoré dokážu narušiť procesy tvorby a prestavby bunkových stien a tak oslabiť kvasinkový organizmus. Pozitívne výsledky by mohli byť prínosom najmä v prípade Phr1 a Phr2, keďže *C. albicans* patrí medzi známe ľudské patogény a práve tieto enzýmy zabezpečujú jej patogenicitu v širokom rozmedzí pH (5).

Testovali sme 67 antimykotických zlúčenín z kolekcie TargetMol Antifungal Compound Library (TargetMol). Na skrining inhibičného účinku týchto látok sme použili tzv. „dot blot“ metódu (7). V prípade Crh1 sme touto metódou zistili zostatkovú aktivitu pod 5% u troch antifungálnych látok: nifuratel, ekonazol nitrát, mezlát dihydrátu pefloxacinu. Pre Crh2 sme takéto inhibičné účinky nestanovili. Testovanie inhibítorov na Phr1 naznačilo účinok berberínu HCl (zostatková aktivita 3,45%) a mikonazol nitrátu (zostatková aktivita 0,26%), ale pre Phr2 sme nenašli žiadnu antifungálnu látku s výraznejšími inhibičnými účinkami. Pre overenie výsledkov získaných pre Phr1 sme použili metódu stanovenia transglykozylačnej aktivity založenú na gélovej filtrácii, ktorá ukázala, že DMSO, v ktorom sú rozpustené inhibítory, znižuje aktivitu enzýmu, pričom samotné pridanie inhibítorov ju neovplyvnilo. Z uvedených výsledkov vyplýva, že ani jedna zo 67 testovaných komerčných antifungálnych látok nemá inhibičné účinky na aktivity kvasinkových transglykozyláz Phr1, Phr2 a Crh2.

Literatúra:

- (1) Farkaš V., Sulová Z., Stratilová E., et al. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 298, p. 36
- (2) Fry S.C., Smith R.C., Renwick K.F., et al. (1992) Biochem. J. 282, p. 821
- (3) Nishitani K., Tominaga R.J. (1992) Biol. Chem. 267, p. 21058
- (4) Cabib, E., Farkaš, V., Kosík, O., et al. (2008) Biol. Chem., p. 29859
- (5) Calderon, J., Zavrel, M., Ragni, et al. (2010) Microbiology 156, p. 2484-2494.
- (6) Fry, S. C. (1997): The Plant Journal 11, p. 1141-1150

Pod'akovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore grantu VEGA 2/0058/16.

Produkcia mykobakteriálnej galaktozyltransferázy GlfT1 za účelom jej perspektívnej štruktúrnej charakterizácie

Konyariková Zuzana¹, Huszár Stanislav¹, Mikušová Katarína¹

¹Laboratórium výskumu mykobaktérií, Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 84215, Bratislava, Slovenská Republika

Mykobakteriálne galaktozyltransferázy GlfT1 a GlfT2 sú esenciálne enzýmy podieľajúce sa na výstavbe bunkovej steny mykobaktérií. Ich úlohou je syntéza galaktánového polyméru, ktorý je súčasťou arabinogalaktánu. Tento rozvetvený polysacharid prepája vonkajšiu vrstvu mykolových kyselín s peptidoglykánom, čím spolu vytvárajú ochrannú vrstvu týchto bacilov.

Medzi mykobaktérie patrí aj *Mycobacterium tuberculosis*, pôvodca tuberkulózy, ktorý je aj vďaka špecifickej štruktúre svojej bunkovej steny mimoriadne odolný. Jej syntéza je preto cieľom pre viaceré druhy antibiotík. Niektoré z antibiotík pôsobia priamo na syntézu mykolových kyselín, ako napríklad izoniazid, či etiónamid (1). Iné antibiotiká, ako napríklad etambutol a benzotiazinóny, inhibujú syntézu arabinánu (2,3). Biosyntéza galaktánu môže predstavovať ďalšiu metabolickú dráhu atraktívnu pre vývoj nových antituberkulotík.

Na výstavbe mykobakteriálneho galaktánu sa podieľajú dve galaktozyltransferázy – GlfT1 a GlfT2. Enzým GlfT1 bol objavený neskôr ako GlfT2 a jeho charakterizácia zatiaľ nie je dostatočná. Jeho bifunkčná β (1→4) a β (1→5) glykozyltransferázová aktivita bola dokázaná vo viacerých štúdiách (4,5), avšak stále chýbajú informácie o jeho štruktúre, či lokalizácii.

Za účelom bližšej charakterizácie tohto enzýmu sme optimalizovali izoláciu GlfT1 z *M. tuberculosis* H37Rv a jeho ortológu z *M. thermoresistibile*. Ortológy proteínov z tohto druhu mykobaktérií sa vyznačujú len minimálnymi zmenami v sekvencii aminokyselín oproti proteínom z patogénneho kmeňa *M. tuberculosis* H37Rv a zároveň vyššou stabilitou (6). Gény Rv3782 a RMCT_0006 boli klonované do expresného vektora pJAM2 (7), ktorý umožňuje indukovanú expresiu vybraných génov v *M. smegmatis*. Proteíny sú tak nadexprimované v prirodzenom prostredí mykobakteriálnej bunky, čo by malo mať pozitívny vplyv na správne zloženie, solubilitu a aktivitu izolovaného rekombinantného proteínu. Za týchto podmienok sa nám podarilo GlfT1 izolovať v aktívnej forme. Prekážkami, ktoré je v budúcnosti treba prekonať, sú slabé naväzovanie proteínu na kolónu a jeho agregácia.

Literatúra:

1. Dessen A., Quémard A., Blanchard J.S., Jacobs W.R. Jr., Sacchettini J.C. (1995) Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 267(5204): 1638-41.
2. Jarlier V., Nikaido H., (1994) Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.*, 123: 11–18.
3. Sauvage, E., Fonze, E., Quinting, B., Galleni, M., Frère, J.M. and Charlier, P. (2006) Crystal structure of the *Mycobacterium fortuitum* class A β -lactamase: Structural basis for broad substrate specificity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2516–2521.
4. Mikušová, K., Beláňová, M., Korduláková, J., Honda, K., McNeil, M.R., Mahapatra, S., Crick, D.C. and Brennan, P.J. (2006) Identification of a novel galactosyl transferase involved in biosynthesis of the mycobacterial cell wall. *J. Bacteriol.* 188, 6592–6598.

5. Beláňová, M., Dianišková, P., Brennan, P.J., Completo, G.C., Rose, N.L., Lowary, T.L. a Mikušova, K. (2008) Galactosyl transferases in mycobacterial cell wall synthesis. *J. Bacteriol.* 190, 1141–1145.
6. Bashiri, G. and Baker, E.N. (2015) Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. *Protein Sci.* 24, 1–10.
7. Triccas, J.A., Parish, T. and Britton, W.J. (1998) An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters* 167, 151–156.

Pod'akovanie: Tento projekt bol podporený Univerzitou Komenského (projekt č. UK/158/219) a Slovenskou agentúrou na podporu výskumu a vývoja (projekt č. APVV-15-0515).

explore

TAKARA



Clontech

cellartis

Stem cell research

**Next-generation
sequencing**

cDNA synthesis

PCR

Single cell

Gene function

Real-Time PCR

Protein research

Antibodies and ELISA



www.explore.cz

MERCK

Experience the next revolution

of Recombinant Rabbit Monoclonal
Antibodies and Beyond ...

ZooMAb[®] Antibodies



www.sigmaaldrich.com/ZooMAb

The life science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in the
U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich[®]
Lab & Production Materials

Zoznam účastníkov

Meno účastníka	Pracovisko	e-mail
Babinčák Marián	UPJŠ KE	marian.babincak@student.upjs.sk
Brodňanová Mária	JLF UK MT	brodnanova7@uniba.sk
Buľková Viktória	UPJŠ KE	viktoria.bulkova@student.upjs.sk
Csekes Erika	CEM SAV BA	erikabrezovska@gmail.com
Dzurjašková Zuzana	BMC SAV KE	dzurjaskova@saske.sk
Elefantová Katarína	FCHPT STU BA	katarina.elefantova@stuba.sk
Galádová Helena	FCHPT STU BA	galadova.helena@gmail.com
Gáliková Martina	ÚZOO SAV BA	martina.galikova@savba.sk
Gondáš Eduard	JLF UK MT	egondas4@gmail.com
Híreš Michal	CHÚ SAV BA	chemhimi@savba.sk
Hoppanová Lucia	FCHPT STU BA	lucka.hopp@gmail.com
Horváthová Ágnes	CHÚ SAV BA	chemagho@savba.sk
Hromníková Dominika	ÚZOO SAV BA	dominika.hromnikova@savba.sk
Hrončeková Štefánia	CHÚ SAV BA	hroncekova.stefania@gmail.com
Kontár Szilvia	CBV SAV BA	szkontar@gmail.com
Konyariková Zuzana	PRIR F UK BA	zuzanakonyarikova@gmail.com
Krahulcová Monika	FCHPT STU BA	monika.krahulcova23@gmail.com
Krasňan Vladimír	FCHPT STU BA	vladimir.krasnan@stuba.sk
Kubalová Dominika	CBV SAV BA	dominika.kubalova@savba.sk
Kyca Tomáš	CBV SAV BA	tomas.kyca@savba.sk
Majerčíková Zuzana	JLF UK MT	majercikova.zuz@gmail.com
Majerník Martin	UPJŠ KE	martin.majernik@upjs.sk
Pagáč Tomáš	FCHPT STU BA	tomaspagac1@gmail.com
Pavlíková Lucia	CBV SAV BA	lucia.pavlikova@savba.sk
Petrovičová Tatiana	FCHPT STU BA	tatiana.petrovicova@stuba.sk
Plž Michal	FCHPT STU BA	michal.plz110@gmail.com
Polozsányi Zoltán	FCHPT STU BA	z.polozsanyi@gmail.com
Savková Karin	PRIR F UK BA	savkova.karin@gmail.com
Schenk Mayerová Andrea	FNUSA - ICRC BRNO	242248@mail.muni.cz
Škandík Martin	CEM SAV BA	martin.skandik@savba.sk
Víglaš Ján	FCHPT STU BA	jan.viglas@stuba.sk
Záhorszka Monika	PRIR F UK BA	zahorszka2@uniba.sk

Odborná komisia

1.	RNDr. Mária Balážová, PhD.	Maria.Simockova@savba.sk
2.	RNDr. Imrich Barák, DrSc.	imrich.barak@savba.sk
3.	doc. Ing. Albert Breier, DrSc.	albert.breier@stuba.sk
4.	prof. RNDr. Peter Fedoročko, CSc.	peter.fedorocko@upjs.sk
5.	doc. Ing. Lucia Bírošová, PhD.	lucia.birosova@stuba.sk
6.	doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.	boris.lakatos@stuba.sk
7.	doc. RNDr. Peter Račay, CSc.	racay@jfmed.uniba.sk
8.	Ing. Zdena Sulová, DrSc.	zdena.sulova@savba.sk
9.	Ing. Marek Bučko, PhD.	chembuck@savba.sk
10.	RNDr. Dušan Žitňan, DrSc.	dusan.zitnan@savba.sk
11.	doc. RNDr. Anton Horváth, CSc.	horvath@fns.uniba.sk
12.	doc. Ing. Vladimír Farkaš, DrSc.	chemvfar@savba.sk

Sponzori Drobnicovho memoriálu

1. ProScience Tech, s.r.o.	
2. BioTech, s.r.o.	
3. MGP, spol. s r. o.	
4. Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.	
5. Merck spol. s r. o.	
6. Explorea s.r.o.	

DROBNICOV MEMORIÁL 10. ročník
11. – 13. september 2019
Penzión Lomnický, Stará Lesná

ISBN 978-80-972752-6-6

Redakčná úprava: doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.

© Vydal: Centrum biovied - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied,
Bratislava 2019