

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

11. ROČNÍK

Chata Trubárka, Trenčín - Kubrica
2. – 4. september 2021



Zborník príspevkov a program

Editori

Mária Balážová, Boris Lakatoš



prof. Ing. Ľudovít DROBNICA, DrSc.

DROBNICOVMEMORIÁL

11. ročník

2. – 4. september 2021

Chata Trubárka, Trenčín - Kubrica

ISBN 978-80-972752-8-0

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

Vydal: Centrum biovied - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied,
Bratislava 2021

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 nosyntetizovaných 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-brómfenylyzotiokyanátu 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 neúnavnosťou 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 totality 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, päťolízračstvom. 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 užitočnosť pre ostatných.

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

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

PRESEDA KOMISIE:

RNDr. Dušan ŽITŇAN, DrSc.

ČLENOVIA KOMISIE:

Mgr. Mária BALAŽOVÁ, PhD.
RNDr. Imrich BARÁK, DrSc.
prof. Ing. Albert BREIER, DrSc.
doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.
doc. RNDr. Jan MALINSKÝ, PhD.
doc. Ing. Petra OLEJNÍKOVÁ, PhD.
prof. RNDr. Peter RAČAY, PhD.
Ing. Martin REBROŠ, PhD.
doc. RNDr. Stanislav STUHLÍK, CSc.
Ing. Zdena SULOVA, DrSc.

Obsah

PROGRAM:	9
ZBORNÍK PRÍSPEVKOV	13
SPONZORI DROBNICOVHO MEMORIÁLU	66

PROGRAM:

1. Deň: 2. 9. 2021 (štvrtok)

Registrácia účastníkov počas celého dňa (od 11:30)

- 12:30 – 14:00 **OBED (Lunch)**
- 14:00 – 14:45 Otvorenie + plenárna prednáška: **Dušan Žitňan: „Geneticky podmienené správanie hmyzu a človeka sú v mnohých prípadoch veľmi podobné.“**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

Predseda: **Albert Breier, Zdenka Sulová**

- 15:00 – 15:15 **Zuzana Majerčíková:** *In vitro* štúdium rezistencie glioblastómových buniek na temozolomid
- 15:15 – 15:30 **Ľuboš Janotka:** Zmeny apoptotických dráh v bunkovej línii MOLM-13 po indukciu rezistencie na hypometylačné činidlá
- 15:30 – 15:45 **Pavol Štefík:** MoS₂ nanokonjugáty špecificky interagujúce s CD33 receptormi buniek akútnej myeloidnej leukémie
- 15:45 – 16:00 **Jana Kubíčková:** Sledovanie cytotoxického účinku fenantrochinelizidínových derivátov na L1210 bunky v závislosti od expresie P-glykoproteínu

16:00 – 16:30 PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)

- 16:30 – 16:45 **Tomáš Kyca:** Účinok bortezomibu na P-gp negatívnu a pozitívnu bunkovú líniiu L1210
- 16:45 – 17:00 **Eva Kocianová:** Potenciálna súvislosť medzi metabolickými preferenciami testikulárnych nádorových buniek a ich citlivosťou na cisplatinu
- 17:00 – 17:15 **Marián Babinčák:** Skyrín – od indukcie apoptózy po zvrátenie rezistencie na TRAIL
- 17:15 – 17:30 **Szilvia Kontár:** Vplyv izotiokyanátov na mechanizmy bunkovej smrti v myších leukemických bunkách.

POSTEROVÁ SEKCIA (17:30-18:30)

Predseda: **Mária Balážová + celá komisia**

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

2. Deň: 3. 9. 2021 (piatok)

7:30 – 9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

Predseda: Imrich Barák, Mária Balážová

- 9:15 – 9:30 **Eduard Gondáš:** Katabolizmus leucínu – potenciálny zdroj acetyl-CoA pre nádory ľudského mozgu
- 9:30 – 9:45 **Lucia Pažitná:** Glykoprolácia sér a plazmy vzoriek tehotenskej cukrovky pomocou na lektínoch založenej microarray
- 9:45 – 10:00 **Ján Viglaš:** Peptaiboly *Trichoderma atroviride* – produkcia a potenciálna biologická aktivita voči mikroorganizmom a nádorovým bunkám
- 10:00 – 10:15 **Lívia Petrisková:** Substrátová špecificita esterifikačných enzýmov Are1p a Are2p
- 10:15 – 10:30 **Matej Medla:** Charakterizácia myoinhibičného peptidu a jeho receptorov u kliešť'a *Ixodes ricinus*
- 10:30 – 10:45 **Daniela Krajčiová:** Štúdium produkcie kyseliny punikovej v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe*
- 10:45 – 11:00 **PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

Predseda: Jan Malínský, Peter Račay

- 11:00 – 11:15 **Alexandra Pitel'ová:** Delícia génov homologickej rekombinácie je u *S. pombe* sprevádzaná rozsiahlou zmenou génovej expresie a celkovej štruktúry chromatinu
- 11:15 – 11:30 **Vanda Klöcklerová:** Identifikácia, expresia a funkcia peptidov príbuzných tachykinínu a ich receptorov u kliešť'a *Ixodes ricinus*
- 11:30 – 11:45 **Mária Brodňanová:** Ako môže deficit horčika zasahovať do odpovede buniek na stres endoplazmatického retikula?
- 11:45 – 12:00 **Lucia Šofranková:** Ceramidy s krátkym acylovým reťazcom a ich vplyv na leukemické bunky
- 12:00 – 12:15 **Paulína Pidíková:** Denný profil expresie komponentov biogenézy miRNA a prekursorových miRNA pre-miR-30c a pre-miR-34a v suprachiazmatických jadrách hypotalamu, srdci, pečeni a obličkách potkana

12:15 – 12:30 **Zoltán Polozsányi:** Vesnovka obyčajná ako potenciálny zdroj prekursorov izotiokyanátov

12:30 – 14:00 **OBED (Lunch)**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

Predseda: Boris Lakatoš, Petra Olejníková

14:00 – 14:15 **Klára Cverenkárová:** Porovnanie vybraného črevného rezistómu zdravých ľudí a pacientov s ochorením pečene

14:15 – 14:30 **Helena Galádová:** Molekulové a katalytické vlastnosti myrozinázy izolovanej z *Lepidium sativum* prostredníctvom celulózového sorbentu s imobilizovaným sulforafanom

14:30 – 14:45 **Paulína Káňovičová:** Potenciálny vplyv fosfatidylglycerolu na manifestáciu Barthovho syndrómu

14:45 – 15:00 **Monika Krahulcová:** Prevalencia rezistentných koliformných baktérií v potravinách typu sushi na Slovensku

15:00 – 15:15 **Kristína Macová:** The development of new molecular tools for studying senescence-like phenotype in neurons

15:15 – 15:45 **Komerčná prezentácia**

15:45 - 16:00 **PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)**

Sekcia III Biotechnológie

Predseda: Martin Rebroš, Stanislav Stuchlík

16:00 – 16:15 **Mária Bláhová:** Extracellular maltooligosaccharide-forming amylase from *Pseudomonas* sp. strain MPA-2

16:15 – 16:30 **Tatiana Petrovičová:** Rekombinantné polymerázy využiteľné v diagnostike vírusových ochorení.

16:30 – 16:45 **Veronika Kazimírová:** Rekombinantná produkcia a kaskádová aplikácia enzýmov lipoxygénazovej dráhy

16:45 – 17:00 **Anna Blšáková:** Detekcia protilátok voči aberantným glykánom

17:00 – 17:15 **Vladimír Krasňan:** Produkcia rekombinatných enzýmov využívaných v diagnostike COVID-19

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

3. Deň: 4. 9. 2021 (sobota)

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 11. ročníka Drobnicovho memoriálu**

12:00 – 13:45 **OBED (Lunch), Odchod (Departure)**

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
Prednášky

Sledovanie cytotoxického účinku fenantrochinolizidínových derivátov na L1210 bunky v závislosti od expresie P-glykoproteínu

Jana Kubičková¹, Katarína Elefantová¹, Petra Olejníková¹, Boris Lakatoš¹, Albert Breier^{1,2}, Zdena Sulová²

¹ Ústav biochémie a mikrobiológie FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

² Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovensko

K závažným problémom súčasnej medicíny patrí vývoj rezistencie na chemoterapeutiká používané pri liečbe onkologických ochorení na základe ich selekčného tlaku na bunky čo spôsobuje, že prevážia bunky so zníženou citlivosťou. U neoplastických buniek dochádza k rozvoju viacliekovej rezistencie najčastejšie v dôsledku zvýšenej expresie P-glykoproteínu a manifestácie jeho efluxnej aktivity. P-glykoproteín (ABCB1) je členom rodiny ABC transportérov, ktorý zabezpečuje elimináciu množstva štruktúrne a biologicky odlišných látok z vnútrobunkového priestoru. Z tohto dôvodu sa pristupuje k hľadaniu a príprave nových biologicky aktívnych látok, ktoré by mali chemoterapeutický účinok, prípadne by prispeli k zvýšenému účinku už existujúcich liečiv bežne používaných pri liečbe onkologických ochorení, no zároveň by nezvyšovali riziko zvýšenej expresie P-glykoproteínu.

V prírode sa vyskytuje viacero rastlinných alkaloidov, z ktorých napr. chinolizidíny, známe aj pod názvom lupínové alkaloidy majú majoritné zastúpenie u rastlín čeľade *Lupinus*, *Leguminosae* a *Faraceae*. Rastlinné chinolizidíny ako také reprezentujú širokú a dobre preštudovanú skupinu látok s rozmanitou biologickou aktivitou. Na základe svojich účinkov nachádzajú široké využitie v tradičnej, ale aj alternatívnej medicíne pri liečbe mnohých ochorení. Vďaka svojej štruktúre, ktorá je vhodná na chemickú modifikáciu, sa opäť dostávajú do popredia pri vývoji nových liečiv, ktorých cieľom je zvýrazniť účinky rastlinných alkaloidov pre potenciálne využitie v modernej medicíne. Jednou zo skupín takýchto látok sú fenantrochinolizidínové alkaloidy s bežnou pentacyklickou štruktúrou, kde je fenantrénový kruh konjugovaný s chinolizidínom. Výhodou fenantrochinolizidínov sú dôkazy, že účinkujú na široké spektrum potencionálnych biologických cieľov. Príkladom je antiproliferatívny účinok spojený so zníženou aktivitou proteínov regulujúcich bunkový cyklus, a to konkrétne cyklínov a kináz závislých na cyklínoch. Pri iných chinolizidínoch bola zase popísaná inhibícia DNA topoizomerázy I, čo viedlo zastaveniu bunkového cyklu vo fáze G0/G1. Mechanizmus účinku fenantrochinolizidínov je dobre známy a najmä odlišný od bežne používaných chemoterapeutík.

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie potencionálneho cytotoxického účinku novosyntetizovaných derivátov chinolizidínu (tienochinolizidínové deriváty a (epi-) benzoanalógy fenantrochinolizidínových alkaloidov) vo vzťahu k expresii P-glykoproteínu. Použili sme P-glykoproteín negatívne L1210 bunky (S) a ich P-glykoproteín pozitívne varianty (R a T). Podarilo sa nám identifikovať najúčinnější (IC₅₀≈13 μM) derivát 2,3,4,6,11,11a-hexahydro-1H-benzo[b]quinolizín, ktorý pôsobil letálne na bunky, bez ohľadu na to, či bunky exprimovali P-glykoproteín alebo nie.

Podakovanie: Prácu podporili projekty: APVV-19-0093 a APVV-19-0094, VEGA 2/0070/19, VEGA 1/0697/18, ITMS 26230120009 a projektu Grantovej schémy na podporu excelentných tímov mladých výskumných pracovníkov STU.

MoS₂ nanokonjugáty špecificky interagujúce s CD33 receptormi buniek akútnej myeloidnej leukémie

Pavol Štefík¹, Adriana Annušová^{2,3}, Boris Lakatoš¹, Katarína Elefantová¹, Lucia Šofranková¹, Monika Hofbauerová², Anna Kálosi³, Matej Jergel^{2,3}, Eva Majková^{2,3}, Peter Šiffalovič^{2,3}

¹ *Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

² *Slovenská akadémia vied, Fyzikálny ústav, Oddelenie multivrstiev a nanoštruktúr, Dúbravská cesta 9, 845 11 Bratislava, Slovenská republika*

³ *Centrum pre využitie pokročilých materiálov, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 11 Bratislava, Slovenská republika*

Akútna myeloidná leukémia (AML) predstavuje závažnú formu rakoviny, pre ktorú je charakteristická nekontrolovateľná proliferácia nezrelých myeloblastov hromadiacich sa v kostnej dreni alebo periférnej krvi [1,2]. Najbežnejším spôsobom terapie AML je systémová chemoterapia, ktorá však zasahuje aj zdravé bunky, čo môže viesť k rôznym vedľajším účinkom. Z tohto dôvodu sa stávajú čoraz viac populárne terapeutické metódy cielene ovplyvňujúce len nádorové bunky.

Spomedzi známych dichalkogenidov prechodných kovov sa z hľadiska potenciálneho využitia v diagnostike a terapii nádorových ochorení venuje najväčšia pozornosť sulfidu molybdeničitému (MoS₂) [3]. Ide o látku s charakteristickou vrstevnatou štruktúrou, ktorá je dostupná ako minerál molybdenit [4], z ktorého je možné pripraviť nanomateriály exfoliačnými metódami. Inou alternatívou je príprava MoS₂ nanomateriálov synteticky z rôznych substrátov obsahujúcich molybdén a síru [3]. Na zvýšenie biokompatibility a koloidnej stability vyžadujú nanomateriály na báze MoS₂ vhodnú funkcionalizáciu, ktorá v sebe zvykne zahŕňať aj väzbu tumor-rozpoznávajúcich prvkov akými sú napríklad protilátky alebo ligandy receptorov, ktoré nádorové bunky v porovnaní so zdravými bunkami (nad)exprimujú [5,6].

V rámci tejto práce sa nám úspešne podarilo pripraviť MoS₂ nanovločky z kryštalického MoS₂ metódou exfoliácie v kvapalnej fáze, ktoré sa ďalej funkcionalizovali anti-CD33 protilátkou. Táto protilátka sa viaže na CD33 receptory exprimované na povrchu buniek línie SKM-1, ktoré slúžili ako biologický model AML. Pomocou laserovej skenovacej a Ramanovej konfokálnej mikroskopie sa potvrdila úspešnosť internalizácie MoS₂ nanokonjugátov a ich prítomnosť na povrchu buniek, ako aj v ich intracelulárnom priestore. S využitím prietokovej cytometrie sa podarilo sledovať príjem MoS₂ nanokonjugátov bunkami a dokázať, že MoS₂ nanokonjugáty funkcionalizované anti CD33 protilátkou interagovali s bunkami SKM 1 špecificky v porovnaní s MoS₂ nanokonjugátmi funkcionalizovanými anti GPC3 protilátkou (prítomnosť GPC3 receptorov nebola dosiaľ u buniek akútnej myeloidnej leukémie zdokumentovaná). V kontexte pozitívnych výsledkov z krátkodobého vplyvu MoS₂ nanokonjugátov na viabilitu buniek SKM-1 môžeme preto konštatovať, že pripravené MoS₂ nanokonjugáty predstavujú potenciálne AML špecifické nanonosiče liečiv.

Literatúra:

- [1] Siveen, K. S. et al. Mol. Cancer, 2017, 16, 13.
- [2] Ilyas, A. M. et al. BMC Genomics, 2015, 16, S5.
- [3] Yadav, V. et al. Small, 2019, 15, 1803706.

[4] Tan, S. M. et al. Chem. - A Eur. J., 2015, 21, 7170–7178.

[5] Stergiou, A. et al. Chem. Eur. J., 2018, 24, 18246-18257.

[6] Zhang, X. et al. Colloids Surf., B., 2019, 173, 101-108.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektov APVV-15-0641, APVV-19-0365 a projektov ITMS 26230120006 a ITMS 313021T081 financovaných z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

In vitro štúdium rezistencie glioblastómových buniek na temozolomid

Zuzana Majerčíková¹, Katarína Dibdiaková¹, Michal Pokusa², Jozef Hatok¹

¹ *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá hora 4D, 03601 Martin*

² *Biomedicínske centrum Martin, Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá hora 4D, 03601 Martin*

Úvod: Temozolomid (TMZ) je ústne podávané alkylačné činidlo, ktoré je spolu s chirurgickým zákrokom a rádioterapiou súčasťou štandardnej liečby mozgových nádorov [1]. Jeho cytotoxický efekt spočíva v metylácii DNA a tvorbe aduktov [2]. Prítomnosť týchto aduktov spôsobuje generovanie jednovláknových a dvojláknových zlomov DNA s následným kolapsom replikačnej vidlice, čo vedie k zastaveniu bunkového cyklu a končí sa bunkovou smrťou. Problémom však je, že väčšina pacientov na terapiu TMZ nereaguje vôbec. Buď sú mozgové malignity prirodzene na TMZ rezistentné alebo dôjde k získaniu rezistencie. O6-metylguanín-DNA-metyltransferáza (MGMT) je enzým, ktorý v jednom kroku odstraňuje metylové skupiny z DNA aduktov a tým zabraňuje toxickému účinku TMZ [3,4]. V súčasnosti je identifikovaných viacero potenciálnych chemoterapeutík pre terapiu glioblastómu. Jedným z nich je Adavosertib (MK-1775) – vysoko špecifický, nízkomolekulový inhibítor kinázovej aktivity Wee1 [5]. Wee1 je kináza zodpovedná za kontrolu progresie bunkového cyklu z G2 do M fázy [6]. Antiproliferačný efekt Adavosertibu v súčasnosti klinicky testovaného, vyvolá zastavenie bunkového cyklu a následnú apoptózu [5]. V kombinácii s TMZ, ktorý sa v liečbe glioblastómu využíva ako jediné chemoterapeutikum, má potenciál zosilniť jeho toxický účinok a zároveň redukovať rast nádorového tkaniva.

Materiál a metódy: Ľudské nádorové bunkové línie glioblastómu (T98G a U87) boli za opakovaného ošetrenia TMZ kultivované pri štandardných *in vitro* podmienkach. Požadovanú rezistenciu bunkovej línie U87 na TMZ sme stanovili expresiou MGMT pomocou kvantitatívnej real-time PCR a imunodetekčnými metódami. Následne sme pozorovali efekt monoterapie TMZ, MK-1775 a ich dvojkombinácie na prežívanie rezistentných a kontrolných glioblastómových bunkových línií. Relatívnu mieru prežívania buniek sme hodnotili kolorimetricky s využitím MTT testu. Glioblastómová bunková línia T98G bola použitá ako kontrolná bunková línia charakteristická vyššou expresiou MGMT.

Výsledky: Detekciou relatívnych hladín mRNA pomocou RT-PCR sme u U87 buniek dlhodobo ošetrovaných TMZ identifikovali zvýšenie expresie MGMT oproti kontrolným U87 bunkám kultivovaným v čistom kultivačnom médiu. Hladina mRNA u týchto buniek bola porovnateľná s T98G bunkovou líniou, ktorá vykazuje relatívne vysokú expresiu génu MGMT. Rezistenciu pôvodne na TMZ senzitívnych U87 buniek potvrdzujú obdobné výsledky získané Western blot analýzou, kedy sme prítomnosť proteínu MGMT zistili iba u U87 buniek dlhodobo kultivovaných s TMZ. Naopak, u T98G sme MGMT identifikovali ako u kontrolnej (neošetrenej s TMZ), tak aj u rezistentnej línie (ošetrenej s TMZ). Po ošetrení U87 rezistentných (U87-R) buniek temozolomidom, MK-1775 a ich dvojkombináciou sme však významný rozdiel v prežívaní oproti kontrolným U87 nezaznamenali.

Záver: Naše dosiahnuté výsledky potvrdzujú navodenie rezistencie glioblastómovej línie U87 na temozolomid expresiou O6-metylguanín-DNA-metyltransferázy. Je však nevyhnutné doplnenie informácií o mechanizme získanej rezistencie ďalšími špecifickými markermi.

Literatúra:

1 Yang LJ a kol (2014) Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review. *Cancer Invest* 32:31-36.

- 2 Denny BJ a kol (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33:9045-9051.
- 3 Lim A a Li BF (1996) The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *EMBO J* 15:4050-4060.
- 4 Zhang J a kol (2012) Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr Mol Pharmacol* 5:102-114.
- 5 Bi S a kol (2019) Wee1 Inhibitor AZD1775 Effectively Inhibits the Malignant Phenotypes of Esophageal Squamous Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo. *Front Pharmacol* 10:864.
- 6 Ghelli Luserna di Rorà A a kol (2020) A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. *J Hematol Oncol* 13:126.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0088 a Grantom Univerzity Komenského na základe Zmluvy č. UK/31/2021.

Potenciálna súvislosť medzi metabolickými preferenciami testikulárnych nádorových buniek a ich citlivosťou na cisplatinu

Eva Kocianová¹, Radivojka Bánová², Katarína Grossmanová¹, Katarína Kaľavská^{3,4}, Tereza Goliaš¹

¹ Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Virologický ústav, Oddelenie nádorovej biológie, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovensko

² Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Virologický ústav, Oddelenie rickettsiologie, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovensko

³ Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Ústav experimentálnej onkológie, Jednotka translačného výskumu, LFUK, NOÚ, Klenová 1, 83310 Bratislava, Slovensko

⁴ Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Ústav experimentálnej onkológie, Oddelenie molekulárnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovensko

Nádorové ochorenie semenníkov sa radí medzi raritné malignity, avšak u mužov v produktívnom veku ide o najčastejšie diagnostikované nádorové ochorenie [1,2]. V posledných desaťročiach incidencia tohto ochorenia narastá [3]. Častý výskyt germinatívnych nádorov semenníkov (TGCT) v mladom veku popiera všeobecnú teóriu vzniku nádorov, podľa ktorej je riziko vzniku nádorového ochorenia priamo úmerné veku človeka. Predpokladá sa, že už počas vnútro maternicového vývinu je plod vystavený rizikovým faktorom, ktoré môžu viesť k vzniku ochorenia. Vďaka zlepšeniu diagnostiky a terapie má väčšina pacientov priaznivú prognózu. Veľmi účinná je terapia pomocou cisplatinu, ktorá pôsobí ako cytostatikum. Avšak v klinickej praxi sa vyskytujú prípady, kedy sú pacienti rezistentní na liečbu cisplatinou [4].

Paradoxom je, že hoci sa nádorové bunky semenníkov používajú ako model v rôznych štúdiách, ich metabolizmus zatiaľ nebol popísaný. Domnievame sa, že existuje súvislosť medzi metabolizmom týchto nádorových buniek a ich citlivosťou na cisplatinu. V našom výskume sa preto zameriavame na zvýšenie citlivosti rezistentných buniek na cisplatinu, pričom sledujeme metabolické stratégie týchto nádorových buniek.

Z našich preliminárnych dát sa javí, že na cisplatinu senzitivne a rezistentné nádorové bunky [5] majú rozdielny metabolizmus. Pomocou metódy Western blot sme detegovali enzým laktát dehydrogenáza A (LDHA) v senzitivných bunkách NTERA-2, ktorý premieňa pyruvát na laktát a je spájaný s glykolytickým metabolizmom. Tento enzým je prítomný v rôznych typoch nádorových buniek a je často asociovaný s agresívnym fenotypom nádorov a nádorovou hypoxiou [6]. Zároveň senzitivne bunky NTERA-2 exprimovali aj B a C izoformy LDH, ktoré katalyzujú opačnú reakciu a premieňajú laktát na pyruvát. Na rozdiel od senzitivných buniek, rezistentné bunky NTERA-2 exprimujú len B a C izoformy LDH. Hoci sme u rezistentných buniek NTERA-2 nezaznamenali expresiu LDHA, v médiu odobratom z týchto buniek sme v hypoxických podmienkach namerali zvýšené hladiny laktátu. Preto predpokladáme, že na produkcii laktátu sa môžu podieľať aj izoformy LDHB alebo LDHC, čo sa pokúsime zistiť pomocou vytvorenia knockoutov jednotlivých LDH izoformami metódou CRISPR. Taktiež sme zistili, že testikulárne nádorové bunky rezistentné na cisplatinu majú zvýšené hladiny dýchacích komplexov a tiež prijímajú viac glutamínu. Z týchto výsledkov sa preto javí, že senzitivne bunky majú glykolytickejší metabolizmus v porovnaní s rezistentnými bunkami, ktoré preferujú oxidatívny metabolizmus. Keďže u senzitivných a rezistentných buniek sme

zaznamenali rozdiely v metabolizme, predpokladáme, že tieto rozdielne metabolické stratégie by mohli súvisieť s ich citlivosťou na cisplatinu. Kombináciou vhodných metabolických inhibítorov s cisplatinou, ako oxamát (inhibítor LDH) a diazoxid (inhibítor dýchacieho komplexu II), sa nám v preliminárnych experimentoch podarilo zvýšiť citlivosť rezistentných buniek na cisplatinu. Predpokladáme, že objasnenie metabolických stratégií nádorov semenníkov pomôže nájsť nové spôsoby liečby tohto ochorenia.

Literatúra:

- [1] CHENG, L., ALBERS, P., BERNEY, D.M., et al. Testicular Cancer. Nature Reviews Disease Primers. 2018, 4(29).
- [2] TRABERT, B., CHEN, J., DEVESA, S. S., et al. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. Andrology. 2015, 3(1):4-12
- [3] FERLAY, J., STELIAROVA-FOUCHER, E., LORTET-TIEULENT, J., et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. European Journal of Cancer. 2013, 49(6):1374-1403
- [4] WINTER, CH., ALBERS, P., Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. Nature Reviews Endocrinology. 2011, 7, 43-53
- [5] SCHMIDTOVA, S., KALAVSKA, K., GERCAKOVA, K., et al. Disulfiram overcomes cisplatin resistance in human embryonal carcinoma cells. Cancers. 2019, 11, 1224-1246.
- [6] FENG, Y., XIONG, Y., QIAO, T., et al. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. Cancer Medicine. 2018, 7, 6124–6136

Pod'akovanie: Práca vznikla za podpory grantov: VEGA 2/0078/19, VEGA 2/0061/21, VEGA 1/0349/21

Zmeny apoptotických dráh v bunkovej línii MOLM-13 po indukcii rezistencie na hypometylačné činidlá

Ľuboš Janotka¹, Lucia Messingerová^{1,2}, Kristína Šimoničová¹, Helena Kavcová¹, Katarína Elefantová², Zdena Sulová¹, Albert Breier^{1,2}

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum Biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05, Bratislava, Slovensko

² Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovensko

Hypometylačné látky (HMA) 5-aza-2'-deoxycytidín (DAC) a 5 azacytidín (AZA) predstavujú schválené liečivá na liečbu myelodysplastického syndrómu a akútnej myeloidnej leukémie (AML). Tieto dve látky sa používajú najmä pri liečbe starších, vysoko-rizikových pacientov nevhodných na štandardnú intenzívnu terapiu [1]. Liečba pomocou HMA vedie k zlepšeniu viacerých klinických parametrov, kvality života aj celkovej doby prežitia pacientov. Najväčším nedostatkom pri terapii HMA predstavuje prítomnosť primárnej rezistencie u veľkej časti pacientov, navyše u pacientov, ktorí spočiatku na liečbu odpovedajú dochádza časom k strate odpovede [2 - 4]. Napriek tomu pre mnohých pacientov HMA predstavujú najvhodnejší spôsob terapie a každým rokom stúpa podiel pacientov liečených práve HMA [5]. Z tohto dôvodu je hlavným cieľom našej práce práve štúdium mechanizmov rezistencie voči HMA.

Z tohto dôvodu sme sa rozhodli študovať práve rozvoj rezistencie voči HMA. V našej štúdii sme ako model pre štúdium AML používali ľudskú bunkovú líniu MOLM 13, z ktorej sme následne pripravili nasledujúce dva varianty sublinií: (i) bunky MOLM-13/DAC rezistentné voči DAC a (ii) MOLM-13/AZA rezistentné voči AZA. Obe sublinie boli získané šesťmesačným selekčným tlakom postupným zvyšovaním koncentrácie buď DAC alebo AZA v kultivačnom médiu. Zaujímavým výsledkom našej práce je, že u rezistentných sublinií MOLM 13/DAC (rezistentná voči DAC, približne 50-násobný nárast IC₅₀), respektíve MOLM-13/AZA (rezistentná voči AZA, približne 20-násobný nárast IC₅₀) sme nepozorovali rozvoj cross-rezistencie. Použitím fluoresceínu konjugovaného s anexínom V a propípidium jodidu sme pozorovali apoptotický spôsob bunkovej smrti u materskej línie MOLM-13 po ovplyvnení DAC alebo AZA, a u sublinií MOLM-13/DAC po ovplyvnení AZA a MOLM -13/AZA po ovplyvnení DAC. U apoptotických buniek sme ďalej pomocou farbičky JC 1 (5,5',6,6'-tetrachlór-1,1',3,3'-tetraetyl-imidokarbocyanínjodid) detegovali zníženie mitochondriálneho membránového potenciálu.

Nakoľko jedným z možných mechanizmov rozvoja sekundárnej rezistencie je deregulácia apoptotických dráh [6], charakterizovali sme úroveň metylácie promótorových oblastí pre 22 génov kódujúcich proteíny regulujúce apoptotické dráhy a vzťah tejto metylácie k expresii príslušných génov. Okrem toho sme sa zamerali na stanovenie úrovni expzie a aktivity proteínov vnútornej a vonkajšej dráhy apoptózy. U rezistentných sublinií sme pozorovali viacero zmien pri regulácii apoptotických dráh v odpovedi na prítomnosť HMA v porovnaní so senzitívnou materskou líniou.

Literatúra:

- [1] D. P. Steensma, "Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018," Blood Cancer J., vol. 8, no. 47, 2018
- [2] S. C. Navada et al., "Clinical development of demethylating agents in hematology," J. Clin. Invest., vol. 124, no. 1, s. 40–46, 2014

- [3] P. Fenaux et al., "Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study," *Lancet Oncol.*, vol. 10, no. 3, s. 223–232, 2009
- [4] H. M. Kantarjian et al., "Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 21, s. 2670–2677, 2012
- [5] A. Österroos et al., "Real-world data on treatment patterns and outcomes of hypomethylating therapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia aged ≥ 60 years," *Br. J. Haematol.*, vol. 189, no. 1, s. e13–e16, 2020
- [6] T. Cluzeau et al., "BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacitidine in MDS and AML patients.," *Oncotarget*, vol. 3, no. 4, s. 490–501, 2012

Pod'akovanie: Táto štúdia bola podporená grantami APVV-19-0093, APVV-19-0094, VEGA 2/0057/18, VEGA 2/0070/19, VEGA 2/0171/21 a MVTS COST CA17104..

Účinok bortezomibu na P-gp negatívnu a pozitívnu bunkovú líniu L1210

Tomáš Kyca¹, Lucia Pavlíková^{1,2}, Viera Boháčová¹, Anton Mišák³, Alexandra Poturnayová¹, Albert Breier^{1,4}, Zdena Sulová¹, Mário Šereš^{1,2}

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

² Ústav zoológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovensko

³ Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

⁴ Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Nádorové bunky majú schopnosť sa postupom času adaptovať na rôzne chemoterapeutiká, ktoré môžu mať rozličnú štruktúru, alebo mechanizmus účinku. V týchto prípadoch hovoríme o rozvoji tzv. mnohopočetnej liekovej rezistencii (z ang. názvu multidrug resistance - MDR) (S.B. Kaye, 1988). Jedným z mechanizmov, ktorý sa podieľa na rozvoji fenotypu MDR patrí expresia transportných púmp z rodiny ABC - tzv. rodina ABC transportérov (Krishna a Mayer, 2000). Jedným z najlepšie preštudovaných transportérov je P-glykoproteín (P-gp), medzi ktorého funkciu patrí ovplyvňovanie permeability plazmatickej membrány nádorových buniek, s čím je spojený transport chemoterapeutík do extracelulárneho priestoru, a teda bunky aj v prítomnosti rôznych chemoterapeutík majú schopnosť prežívať - rezistencia nádorových buniek (Juliano a Ling, 1976). Ako experimentálny model nám poslúžili bunky myšej leukemickej línie L1210. Využívali sme tri varianty týchto buniek, neexprimujúce P-gp (senzitivne, S) a exprimujúce P-gp (rezistentné, R - získané postupnou adaptáciou na chemoterapeutikum vinkristín ; transfekované, T - senzitivne s transfekovaným plazmidom kódujúcim ľudský P-gp) (Poleková a kol., 1992). Pre účinok niektorých chemoterapeutík je charakteristická akumulácia nesprávne zložených proteínov, ktoré podliehajú ubikvitinácii a následnej proteazomálnej degradácii. V prípade akumulácie nesprávne zložených proteínov dochádza k aktivácii tzv. odpovedi na nesprávne zložené proteíny, pre ktorú je charakteristická zvýšená expresia molekulárnych šaperónov (napr. GRP78/Bip) (Avril a kol., 2017). Zistili sme, že P-gp exprimujúce bunky L1210 sú rezistentnejšie na (inhibitor N-glykozylácie) tunikamycín, induktor stresu endoplazmatického retikula (Seres a kol., 2020). V našej práci sme sa zamerali na účinok bortezomibu (inhibítora proteazómu) ako potencionalneho induktora stresu ER (Takenokuchi a kol., 2015) a sledovali sme jeho účinok na náš experimentálny model buniek v súvislosti s jeho efektom na viabilitu S, R a T buniek v koncentráciách nepresahujúcich 10 nM. Pozorovali sme zvýšený podiel buniek v G2/M fáze bunkového cyklu. Ďalej sme pozorovali aj zvýšenie hladiny polyubikvitinovaných proteínov (prostredníctvom väzby cez lyzín K48) a zníženie génovej expresie cyklínov, cyklín dependentných kináz. Ďalej sme sa zamerali na expresiu regulátorov bunkového cyklu rodiny Cip/Kip a niektorých deubikvitináz účinkom bortezomibu. R bunky

navyše exprimovali vyššie hladiny génov kódujúcich komponenty 26S proteazómu a rovnako aj šaperónu Hsp90, ktorý je zapojený do kompletovania 26S proteazómu.

Literatúra:

- JULIANO, R. L. a LING, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1976, vol. 455, s. 152-162.
- KAYE, S. B. 1988. The multidrug resistance phenotype. *Br. J. Cancer.* 1988, vol. 58, s. 691-694.
- KRISHNA, R. a MAYER, L. D. 2000. Multidrug Resistance (MDR) in Cancer. Mechanisms, Reversal Using Modulators of MDR and the Role of MDR Modulators in Influencing the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, vol. 11, s. 265-283.
- POLEKOVÁ, L. a kol. 1992. Adaption of mouse leukemia cells L1210 to vincristine. Evidence for expression of P-glycoprotein. *Neoplasma.* 1992, vol. 39, s. 73-77.
- SERES, M. a kol. 2020. Overexpression of GRP78/BiP in P-Glycoprotein-Positive L1210 Cells is Responsible for Altered Response of Cells to Tunicamycin as a Stressor of the Endoplasmic Reticulum. *Cells.* 2020, vol. 9, s. 1-23.
- TAKENOKUCHI, M. a kol. 2015. Bortezomib Causes ER Stress-related Death of Acute Promyelocytic Leukemia Cells Through Excessive Accumulation of PML-RARA. *Anticancer Res.* 2015, vol. 35, s. 3307-3316.

Pod'akovanie: Táto práca vznikla s podporou: grant VEGA 2/0157/18, VEGA 2/0070/19, VEGA 2/0159/19 a VEGA 2/0171/21, grant APVV-19-0093 a APVV-19-0094, grant SAV v rámci programu pre podporu doktorandov APP0011.

Skyrín – od indukcie apoptózy po zvrátenie rezistencie na TRAIL

Marián Babinčák, Rastislav Jendželovský, Ján Košuth, Martin Majerník, Jana Vargová, Peter Fedoročko

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

Skyrín (SKR) je prírodná biomolekula vyskytujúca sa v *Hypericum* spp. Táto molekula s bisantrachinónovou štruktúrou sa prirodzene vyskytuje vo veľkom množstve rôznych húb, lišajníkov a rastlín. Hoci bola cytotoxicita SKR testovaná na viacerých ľudských a zvieracích bunkových líniiach, presný mechanizmus účinku SKR dosiaľ nie je známy.

Na stanovenie vplyvu SKR na bunkové línie kolorektálneho adenokarcinómu sme v našich experimentoch použili bunkové línie HCT 116, HT-29 a SW620. Nakoľko je prostredie solídnych tumorov často hypoxické, na zvýšenie robustnosti nami získaných výsledkov sme všetky experimenty uskutočnili paralelne v hypoxických (1% kyslíka) a v normoxických podmienkach (20% kyslíka). Vykonané boli testy metabolickej aktivity buniek (MTT assay), stanovenie celularity, viability, množstva apoptotických a mŕtvych buniek, fázy bunkového cyklu a klonogénnej schopnosti týchto buniek. Ďalej bola vykonaná komparatívna proteomická analýza nasledovaná bioinformatickou analýzou získaných dát a ich verifikáciou s využitím RT-qPCR.

SKR mal negatívny efekt na nádorové bunkové línie HCT 116 a HT-29 v hypoxických a normoxických podmienkach. Efekt SKR na bunkovú líniu HCT 116 bol výraznejší, čo sa prejavilo zníženou metabolickou aktivitou (MTT assay), celularitou a akumuláciou buniek v G1 fáze bunkového cyklu. Zaznamenali sme taktiež signifikantný nárast množstva apoptotických buniek v hypoxii aj normoxii. Na základe výsledkov z komparatívnej proteomickej analýzy (kompletné dáta sú dostupné prostredníctvom databázy ProteomeXchange s identifikátorom PXD019995) sme bioinformatickou analýzou zistili, že SKR signifikantne upreguluje Receptor smrti 5 (DR5; Death receptor 5; TNFRSF10B, UniProt O14763). Tieto zistenia sme potvrdili aj s využitím RT-qPCR. Nárast množstva tohto receptora na TRAIL je spojený so zvrátením rezistencie na TRAIL v hypoxii ako aj pri TRAIL rezistentných bunkových líniiach (HT-29 a SW620). Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že SKR môže byť využitý ako protinádorové liečivo respektíve ako adjuvans pri liečbe zacielenej na receptory TRAIL.

Pod'akovanie: Táto práca vznikla s podporou: APVV-18-0125, VEGA 1/0022/19 a projektu OPENMED (ITMS2014+: 313011V455) spolufinancovaného zo zdrojov ERDF.

Vplyv izotiokyanátov na mechanizmy bunkovej smrti v myších leukemických bunkách.

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

¹ Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovensko

² Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Izotiokyanáty, ktoré sú produktami hydrolytického štiepenia glukozinolátov, sú schopné inhibovať iniciáciu, resp. progresiu rakoviny *in vivo* aj *in vitro*. Indukujú detoxifikáciu karcinogénov, zastavenie bunkového cyklu, aktiváciu apoptózy, resp. iného typu bunkovej smrti a inhibujú angiogénu a metastázovanie nádorových buniek.

Cieľom experimentálnej práce bolo nadviazať na výsledky získané sledovaním vplyvu sulforafanu (SFN) a alyzotiokyanátu (AITC) na myšie leukemické bunkové línie L1210/S (parentálna bunková línia), ako aj na dve sublínie s P-gp pozitívnym fenotypom L1210/R a L1210/T (odvodené od parentálnej bunkovej línie). Na základe zistení, že tieto dva izotiokyanáty v testovaných bunkových líniách nespôsobujú výrazný nástup apoptózy, sme sa zamerali na analýzu indukcie iného typu bunkovej smrti – autofágie. Sledovali sme zmeny v expresii 16 kDa a 18 kDa proteolytického produktu proteínu LC3B. Detekcia sa uskutočnila analýzou produktov proteolytického štiepenia proLC3 proteínu (LC3B I a LC3B II) pomocou metódy Western blot. V P-gp negatívnej parentálnej bunkovej línii L1210/S, ako aj v oboch P-gp pozitívnych bunkových variantoch sme potvrdili prítomnosť cytosolickej (18 kDa) aj membránovo-viazanej (16 kDa) formy LC3B proteínu. Zvyšujúca sa koncentrácia oboch použitých ITC mala za následok výrazné zmeny v ich hladinách.

Metódou prietokovej cytometrie sme pomocou lyzotrackeru (LTG), ktorý má afinitu ku kyslým bunkovým kompartmentom, detegovali prítomnosť autofagolizozómov v bunkách. Vyššie koncentrácie SFN a AITC spôsobili výrazný nárast signálu fluorescencie LTG, ktorý zodpovedá zvýšenému objemu štruktúr s kyslým prostredím v bunkách. Indukciu autofágie sme následne potvrdili aj konfokálnou mikroskopiou. Na vizualizáciu autofagolizozomálnych štruktúr sme použili monodanzylkadaverín (MDC), farbičku, ktorá emituje modrú fluorescenciu a prednostne sa akumuluje v autofagických vezikulách. Proces autofágie vplyvom SFN prebiehal vo všetkých bunkových variantoch, v prípade AITC je MDC intenzívnejšie zadržaný v L1210/S bunkách, čo korešponduje s výsledkom detekcie proteolytických produktov LC3 proteínu Western blot metódou.

Uvedené experimenty boli realizované použitím komerčne dostupného SFN (Merck), avšak v ďalšej práci sme sa zamerali na sledovanie inhibičného efektu SFN po hydrolytickom štiepení laboratorne izolovaného glukozinolátu – glukorafanínu, ktorý je jeho prirodzeným prekursorom. Na enzymatickú konverziu glukorafanínu na SFN sme použili rekombinantne pripravenú myrozínázu [1]. Cytotoxický efekt získaného biologicky aktívneho SFN, ktorý efektívne znižoval metabolickú aktivitu testovanej bunkovej línie L1210/S sme stanovili MTT testom.

Literatúra:

1. Rosenbergova, Z.; Kantorova, K.; Simkovic, M.; Breier, A.; Rebroš, M. Optimisation of Recombinant Myrosinase Production in *Pichia pastoris*. *Int J Mol Sci* 2021, 22, doi:10.3390/ijms22073677.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektov: APVV-16-0439, VEGA 2/0130/21

Delécia génov homologickej rekombinácie je u *S. pombe* sprevádzaná rozsiahlou zmenou génovej expresie a celkovej štruktúry chromatinu

Alexandra Piteľová, Silvia Bágeľová Poláková

Centrum biovied SAV, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika;

Súčasne prebiehajúce projekty súvisiace s novoobjaveným proteínom Dbl2 v bunkách kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, sú zamerané najmä na objasnenie jeho funkcie. Z predchádzajúcich experimentov je známe, že Dbl2 sa podieľa najmä na správnom priebehu mitózy, meiózy a lokalizácii helikázy Fbh1, ktorá je dôležitá v procese homologickej rekombinácie, najmä v priebehu odstraňovania proteínu Rad51 z Rad51-ssDNA filamentu. Analýza proteín-proteínových interakcií prostredníctvom kvasinkového dvojhybridného systému ukázala v prípade Dbl2 zaujímavý jav, a to, že fúzia génu *dbl2* a GAL4 DNA-viažucej domény spúšťa expresiu reportérového génu. Tento objav naznačoval funkciu proteínu Dbl2 v génovej expresii.

Výsledky transkriptomických analýz ukázali, že delécia génov homologickej rekombinácie je v bunkách *S. pombe* sprevádzaná zmenou v expresii mnohých lokusov, ktorých expresia je za normálnych okolností veľmi nízka. V bunkách *S. pombe* je represia génovej expresie zabezpečovaná viacerými spôsobmi. Naším hlavným cieľom preto bolo identifikovať dráhu vedúcu k utlmovaniu génovej expresie, v ktorej participuje aj proteín Dbl2. Naše zistenia naznačujú mechanizmus, akým sa môže proteín homologickej rekombinácie podieľať aj na systematickej regulácii génovej expresie. Taktiež sme ukázali, že delécia génu *dbl2* v bunkách *S. pombe* ovplyvňuje stabilitu nukleozómov v okolí začiatkov transkripcie, čo naznačuje zapojenie proteínu Dbl2 v procese destabilizácie nukleozómov a celkovej zmeny architektúry chromatinu, vrátane zmien v štruktúre transkripčne neaktívneho heterochromatinu.

Pod'akovanie: Táto práca vznikla s podporou projektov: APVV-18-0219, VEGA 2/0034/19 a Doktorant APP0171.

Peptaiboly *Trichoderma atroviride* – produkcia a potenciálna biologická aktivita voči mikroorganizmom a nádorovým bunkám

Ján Víglaš¹, Simona Dobiasová², Jitka Viktorová², Helena Gbelcová³, Petra Olejníková¹

¹ Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

² Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta Potravinárské a Biochemické Technologie, Vysoká Škola Chemicko-Technologická v Praze, Technická 3, 166 28, Praha

³ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

Krátke bioaktívne peptidy sa dostali do popredia vedeckého záujmu najmä kvôli nárastu rezistencie voči antibiotikám (mikroorganizmy) a chemoterapeutikám (nádorové bunky). Existujú rozsiahle štúdie zaoberajúce sa možným antimikrobiálnym potenciálom živočíšnych peptidov [1]. Avšak tento typ metabolitov je možné nájsť aj v ríši húb. *Trichoderma* sp. je producentom sekundárnych metabolitov nazývaných peptaiboly, peptidov dlhých 4-21 aminokyselín s obsahom nekanonickej aminokyseliny α -aminoizomaslovej. V tejto práci sme analyzovali produkciu peptaibolov *Trichoderma atroviride* O1 s následným posúdením efektu týchto peptidov na rast gram-pozitívnych baktérií a na proliferáciu nádorových buniek. V zmesi vyizolovaných metabolitov sme detegovali atroviridíny (19-zvyškové peptaiboly), pričom ich produkcia korelovala s expresiou génu pre peptaibol syntázu. Vrchol produkcie bol dosiahnutý v stacionárnej fáze rastu vláknitej huby. Aktivita extraktov peptaibolov získaných z tohto bodu kultivácie silne potlačila rast modelových baktérií, pričom rast metilín-rezistentného kmeňa *Staphylococcus aureus* bol potlačený pod úroveň 10 % v porovnaní s kontrolou. Inhibíciu rastu baktérie peptaibolmi sme dokázali modulovať prídavkom kyseliny lipoteichovej do kultivačného média. Prídavok sérových proteínov nemal významný efekt na elimináciu inhibičného účinku. V súčasnosti sa na bioaktívne peptidy nehľadí len ako na prostriedky, ktoré by mohli mať významnú antimikrobiálnu aktivitu, ale aj ako alternatívy v boji s nádorovými bunkami rezistentnými voči chemoterapeutikám [2]. Preto sme sledovali efekt peptaibolov na proliferáciu bunkových línií MCF-7 a HOC a ich paklitaxel- (MCF-7/PAC) a doxorubicín- (HOC/ADR) rezistentných sublínií. Peptaiboly ovplyvnili proliferáciu buniek v 2D modeli a ovplyvnili veľkosť a tvar bunkových línií v 3D modeli. Naše výsledky objasňujú kinetiku produkcie peptaibolov *T. atroviride* O1, ako aj ich potenciál v oblasti antimikrobiálnych peptidov a zlúčenín s protinádorovým potenciálom.

Literatúra:

- [1] T. Rončević, J. Puizina, and A. Tossi, "Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era?," *Int. J. Mol. Sci.*, 20(22), p. 5713, Nov. 2019, doi: 10.3390/ijms20225713.
- [2] M. Bondaryk, M. Staniszevska, P. Zielińska, and Z. Urbańczyk-Lipkowska, "Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds," *Journal of Fungi*, 3(3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 46, Aug. 26, 2017, doi: 10.3390/jof3030046.

PodĎakovanie: Práca bola podporená projektom VEGA-1/0697/18 a grantovou schémou STU pre mladých výskumných pracovníkov.

Potenciálny vplyv fosfatidylglycerolu na manifestáciu Barthovho syndrómu

Paulína Káňovičová¹, Jan Malínský², Mária Balážová¹

¹ Ústav biochémie a genetiky živočíchov CBv SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

² Ústav experimentální medicíny AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, CZ

Mitochondriálne membrány pozostávajú z mozaiky veľkého množstva proteínových komplexov, ktoré sú vnorené do lipidovej dvojvrstvy tvorenej prevažne fosfolipidmi. Medzi tieto proteíny patria najmä komplexy dýchacieho reťazca, ATP syntáza, prenášače metabolitov a proteínové transportéry. Najznámejším mitochondriálnym fosfolipidom je kardiolipín (CL), ktorý sa vďaka svojim špecifickým vlastnostiam (dva záporné náboje, kónický tvar, štyri zvyšky mastných kyselín) priamo podieľa na fungovaní mitochondriálnych membránových proteínov. Okrem tvorby ATP sa podieľa aj na mitofágii, či apoptóze. Z tohto dôvodu boli poruchy metabolizmu CL asociované s mnohými civilizačnými ochoreniami [1]. Barthov syndróm (BTHS) je závažné dedičné ochorenie, priamo spôsobené nedostatkom CL. Vzniká v dôsledku mutácie v géne *TAZ*, ktorý kóduje transacylázu tafazzín, dôležitú pre proces remodelingu CL. Porucha remodelingu vedie k akumulácii monolizokardiolipínu (MLCL) a k poklesu celkového množstva CL. Kvasinkový model BTHS *taz1Δ* bol použitý vo viacerých publikáciách, ktorých výsledky významne prispeli k našim poznatkom o tomto ochorení [1]. Kvasinky však v porovnaní s cicavčiami bunkami obsahujú menšie množstvo prekursoru CL – fosfatidylglycerolu (PG), ktorý je v prípade cicavčích buniek s prerušeným *TAZ* génom akumulovaný [2]. Keďže je PG minoritný mitochondriálny fosfolipid, často je mnohými autormi prehlíadaný. Množiac sa dôkazy však poukazujú na to, že je nielen schopný plniť niektoré funkcie chýbajúceho CL, ale že sa sám podieľa na aktivite niektorých mitochondriálnych proteínov, napr. cytochróm c oxidázy [3].

Množstvo PG v kvasinkových mitochondriách je regulované na úrovni jeho syntézy fosfatidylglycerolfosfát syntázou Pgs1 a PG špecifickou fosfolipázou C Pgc1. Prerušenie génu *PGC1* vedie k akumulácii PG v mitochondriách, ale aj v iných membránach, ako je napríklad ER [3]. S cieľom pripraviť kvasinkový model BTHS, s lipidovým profilom podobnejším k cicavčím modelom BTHS, sme zostrojili dvojitý mutant *pgc1Δtaz1Δ*, ktorý mal znížené množstvo CL a okrem MLCL akumuloval aj PG. Napriek prvotným očakávaniam, akumulácia PG spôsobila ďalšie zhoršenie defektov pozorovaných v jednoduchom mutante *taz1Δ*. Medzi tie patria narušená morfológia mitochondrií a znížená funkcia oxidačnej fosforylácie. V *taz1Δ* sme tiež pozorovali zmenenú reguláciu syntézy a degradácie PG, s cieľom vyhnúť sa jeho akumulácii. Tieto výsledky nám poskytujú nový pohľad na úlohu PG v mitochondriách a zároveň efektívnejší kvasinkový model pre štúdium BTHS. Množstvo PG sme sa pokúsili navýšiť aj pridaním kyseliny valproovej (VPA), u ktorej bolo popísané, že zvyšuje aktivitu Pgs1 a tým syntézu PG. VPA je liečivo s pleiotrofným účinkom na bunky, ktoré sa už niekoľko desiatok rokov používa na liečbu epilepsie a bipolárnej poruchy [4]. V podmienkach podporujúcich biogénu mitochondrií sme síce nepozorovali vplyv VPA na množstvo PG alebo CL, avšak kultivácia *taz1Δ* a dvojitého mutantu *pgc1Δtaz1Δ* s VPA viedla k zlepšeniu niektorých mitochondriálnych funkcií. Význam štúdia vplyvu VPA na mitochondrie spočíva aj v pribúdajúcich využitíach tohto liečiva, medzi ktoré patrí chemoterapia a liečba vírusových ochorení [5].

Literatúra:

[1] Basu Ball W., Neff J. K., Gohil V. M. (2018) FEBS lett. 592(8), p. 1273

[2] Vreken P., Valianpour F., Nijtmans L.G. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 279 (2000), p. 378L

- [3] Kubalová D., Káňovičová P., Veselá P. et al. (2019) FEMS Yeast Res. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz045>.
- [4] Zhong Q., Greenberg M. L. (2003) J Biol Chem. 278(36), p.33978
- [5] Romoli M., Mazzocchetti P., D'Alonzo R., et al. (2019) Curr. Neuropharmacol. 17(10), p. 926

Pod'akovanie: Práca vznikla za podpory VEGA 2/0165/18, Doktografant APP0170, APVV-20-0129, MAD SAV-18–25, MVTS COST CA19105, GA ČR 19-04052S a Slovenská akadémia vied SAS-MOST JRP 2016/4.

Substrátová špecificita esterifikačných enzýmov Are1p a Are2p

Lívia Petrisková, Martin Valachovič

*Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, Ústav biochémie a genetiky živočíchov,
Oddelenie biochémie membrán, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika*

Kvasinky, ako mikroorganizmy rastúce na živočíšnych a rastlinných substrátoch, sú periodicky vystavované prostrediu s obmedzeným množstvom kyslíka – hypoxii. Keďže niektoré bunkové procesy sú na kyslíku závislé, kvasinky si vyvinuli rôzne adaptačné mechanizmy ako hypoxický stres kompenzovať. Jedným z takýchto mechanizmov je schopnosť importovať esenciálny membránový lipid – sterol, ktorého biosyntéza je v podmienkach bez kyslíka inhibovaná, alebo nemožná. Kvasinky dokážu utilizovať rôzne steroly pričom ich osud v bunke pravdepodobne závisí od ich štruktúry. Niektoré štruktúry ako napríklad cholesterol sú esterifikované a uložené v lipidových partikulách, na rozdiel od exogénne prijatého ergosterolu, ktorý je esterifikovaný len vo veľmi malej miere [1]. V kvasinkách katalyzujú tvorbu steryl esterov proteíny Are1p a Are2p [2]. Tieto enzýmy majú rôznu aktivitu v aeróbných a anaeróbných podmienkach [3]. Naša hypotéza je, že miera esterifikácie môže slúžiť ako marker kompatibility prijatých sterolov. Viac esterifikované steroly ako napríklad cholesterol sú uložené do lipidových partikul, zatiaľ čo natívny ergosterol nie je esterifikovaný, ale je inkorporovaný do membrán [1].

Cieľom nášho experimentu bolo zistiť špecificitu esterifikačných enzýmov Are1p a Are2p voči rôznym sterolom v anaerobióze. Využili sme kvasinkový kmeň *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý má deléciu vo všetkých štyroch esterifikačných enzýmoch ($\Delta are1\Delta are2\Delta lro1\Delta dga1$; LD-less mutant, niekde tiež nazývaný QM mutant) a nesie plazmid s nadexprimovaným Are1p alebo Are2p a ako kontrolu štandardný kmeň (WT) a QM bez prítomnosti plazmidov. Tieto kmene sme anaeróbne kultivovali 24 hodín v médiách suplementovaných rôznymi sterolmi a ich kombináciami a následne sme analyzovali neutrálne lipidy pomocou TLC.

V prípade kmeňov s nadexprimovanými esterifikačnými enzýmami Are1p alebo Are2p sme nezaznamenali veľké rozdiely navzájom a ani v porovnaní s kontrolou, bunkami štandardného kmeňa. Oba kmene rástli na všetkých steroloch a vo vyššej miere esterifikovali cholesterol a sitosterol, čo naznačuje, že enzýmy Are1p a Are2p majú podobnú substrátovú preferenciu pre externe prijaté molekuly sterolov v anaerobióze. Prekvapivo ani nadexpresia aeróbnej verzie esterifikačného enzýmu Are2p nezabezpečila esterifikáciu externe prijatého ergosterolu v anaerobióze.

Literatúra:

- [1] Valachovic M., Hronská L., Hapala I. (2001) FEMS Microbiol. Lett. 197(1), p. 41-45
- [2] Yang H., Bard M., Bruner D. A., et al. (1996) Science 272(5266), p. 1353-1356
- [3] Valachovic M, Klobucnikova V., Griac P., et al. (2002) FEMS Microb. Lett. 206(1), p. 121-125

Pod'akovanie: Práca vznikla s finančnou podporou grantu VEGA 2/0106/20 a Doktograd APP0213.

Porovnanie vybraného črevného rezistómu zdravých ľudí a pacientov s ochorením pečene

Klára Cverenkárová¹, Petra Olejníková², Monika Krahulcová¹, Ľubomír Skladaný³,
Lucia Bírošová¹

¹ Ústav potravinárstva a výživy, Oddelenie hodnotenia výživy a kvality potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

² Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

³ Fakultná nemocnica s poliklinikou F.D. Roosevelta, Nám. L. Svobodu 1, 975 17 Banská Bystrica, Slovensko

Úvod: Okrem mikroorganizmov priaznivo vplyvujúcich na zdravie jedinca sa v črevnej mikrobiote človeka môžu nachádzať aj baktérie rezistentné voči antibiotikám. Ich prítomnosť môže byť ovplyvnená viacerými faktormi, ako stravou, užívaním antibiotík, vekom a celkovým zdravotným stavom hostiteľa. Cieľom tejto práce preto bolo porovnať výskyt vybraných génov rezistencie voči antibiotikám v celkovej DNA izolovanej zo stolice zdravých ľudí a pacientov s ochorením pečene. Pre amplifikáciu boli zvolené gény rezistencie kódujúce produkciu širokospektrálnych betalaktamáz blaTEM, blaSHV a blaOXA, ktoré sa vyskytujú u baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* a spôsobujú rezistenciu voči cefalosporínom 3. generácie. Ďalším testovaným génom rezistencie bol vanA, vyskytujúci sa u rodu *Enterococcus*, ktorý spôsobuje rezistenciu voči vankomycínu a teikoplanínu. Uvedené gény rezistencie predstavujú značnú hrozbu pre verejné zdravie kvôli ich možnosti šírenia na plazmidoch a vzniku komplikácií pri liečbe infekcií. Taktiež baktérie nesúce tieto gény sú bežnou súčasťou črevnej mikrobioty človeka.

Materiály a metódy: Celková DNA bola izolovaná zo vzoriek lyofilizovanej (zdraví ľudia) alebo čerstvej stolice (pacienti) pomocou komerčnej súpravy na izoláciu genomickej DNA. Gény rezistencie blaTEM, blaSHV, blaOXA a vanA boli amplifikované pomocou optimalizovaných PCR a ich prítomnosť bola vyhodnotená gélovou elektroforézou (Dallenne a kol., 2010; Depardieu, 2004). Vzorky stolice zdravých ľudí pochádzali od 122 osôb (61 žien, 61 mužov) z Bratislavy vo veku 20 až 60 rokov. Súbor stolíc pacientov tvorilo 45 vzoriek od 35 pacientov (12 žien, 23 mužov) vo veku 19 až 66 rokov z Hepatologického, gastroenterologického a transplantáčného oddelenia II. Internej kliniky SZU. V čase odberu vzorky 28 pacientov užívalo antibiotiká.

Výsledky: U zdravých osôb bola zistená prítomnosť min. jedného génu rezistencie u 50,8 % vzoriek celkovej DNA. U pacientov sa gény rezistencie vyskytovali v 68,9 % vzoriek. Najčastejšie sa u zdravých osôb vyskytovali gény blaTEM a vanA (32,8 a 24,6 %), blaOXA a blaSHV boli zastúpené v nižšej miere (8,2 a 0,8 %). V celkovej DNA od pacientov zhodne prevládala prítomnosť týchto génov, avšak v poradí vanA a blaTEM (43,8 a 22,9 %). Pri vanA sme zaznamenali výrazný nárast pozitívnych vzoriek u pacientov. Taktiež aj gény blaOXA a blaSHV sa vyskytovali v značne vyššej miere ako u zdravých osôb (20,8 a 12,5 %). Pri vyhodnotení podľa pohlavia, u zdravých žien prevládala výskyt génov blaTEM, vanA a blaSHV a u mužov blaOXA. V prípade pacientov - žien sa v celkovej DNA vyskytovali viac gény blaTEM a blaSHV a u pacientov - mužov gény vanA a blaOXA. Gény rezistencie sa vyskytovali v 71,4 % vzoriek celkovej DNA zo stolice pacientov, ktorí boli liečení antibiotikami, čo naznačuje, že ich užívanie môže mať výrazný vplyv na črevný rezistóm.

Záver: Sledované gény rezistencie voči antibiotikám boli prítomné v stolici pacientov, ale aj zdravých osôb. Vo vyššej miere sa vyskytovali u pacientov s ochorením pečene, pričom väčšina z nich v dobe odberu vzorky užívala antibiotiká. Takisto podľa výsledkov tejto práce aj ochorenie pečene a celkový zdravotný stav jedinca vplývajú na výskyt génov rezistencie. Hospitalizácie týchto pacientov vedú k ich zvýšenému kontaktu s baktériami v nemocnici, ktoré sú často vysoko rezistentné voči antibiotikám a môžu sa stať súčasťou ich črevnej mikrobioty aj s génmi rezistencie, ktoré obsahujú. Výsledky však ukazujú, že gény rezistencie sú aj bežnou súčasťou črevného mikrobiómu zdravých ľudí.

Literatúra:

- DALLENNE, C. et al. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. In Journal of Antimicrobial Chemotherapy. ISSN 1460-2091, 2010, 65(3), s. 490-495.
- DEPARDIEU, F. 2004. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. In Journal of Clinical Microbiology. ISSN 0095-1137, 2004, 42(12), s. 5857-5860.

Podakovanie: Autori ďakujú STU za finančnú podporu v rámci Grantovej schémy na podporu mladých výskumníkov a projektu VEGA 1/0464/21.

Katabolizmus leucínu – potenciálny zdroj acetyl-CoA pre nádory ľudského mozgu

Eduard Gondáš¹, Alžbeta Kráľová Trančíková², Eva Baranovičová², Dušan Dobrota¹
Radovan Murín¹

¹ *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave (JLF UK)*

² *Biomedicínske centrum Martin, JLF UK v Martine*

Úvod: Transformovaný metabolizmus mozgových nádorových buniek závisí od dostupnosti vhodných substrátov z ich prostredia, ale zároveň aj od prechodu substrátov hematoencefalickou membránou (1). Popri glukóze sú na udržanie bunkového metabolizmu nádorových buniek potrebné aj esenciálne aminokyseliny, pričom metabolizmus aminokyselín s rozvetveným reťazcom (BCAA) je spájaný s proliferáciou, metabolizmom aj tumorigenézou (2). Nádorové bunky nadmerne exprimujú transportéry pre import BCAA zo svojho mikroprostredia, tým pádom aj leucínu, čo vedie ku možnosti ich intracelulárneho katabolizmu (3). Prvou reakciou v metabolizme Leu je jeho reverzibilná transaminácia 2-oxoglutarátom na 2-oxoizokaproát a glutamát (4). Následne môže 2-oxoizokaproát vstúpiť do ireverzibilnej časti katabolizmu, za ktorú je zodpovedných niekoľko enzýmov. Medzi ne patrí aj 3-metylkrotonyl-CoA karboxyláza (MCC), unikátny enzým ireverzibilnej katabolickej dráhy Leu (5). Koncovým metabolitom metabolizmu Leu sa stáva ketolátka, acetoacetát, ktorá je zdrojom 2 molekúl acetyl-CoA. Acetyl-CoA môže vstupovať buď do Krebsovho cyklu a spolupodieľať sa na energetickom metabolizme bunky, alebo byť použitý na syntézu mastných kyselín, cholesterolu a lipidov. Acetyl-CoA je tiež substrátom pre acetylázy, ktoré majú regulačný efekt. Napríklad histón acetylázy vplývajú na epigenetickú reguláciu expresie génov (6).

Materiál a metódy: Ľudské nádorové bunkové línie (SW1088, A172, SH-SY5Y) boli prvotne podrobené metabolomickej analýze pomocou 1H-NMR, z dôvodu sledovania schopnosti vychytávania esenciálnych látok z kultivačného média. Následne sme sledovali pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s hmotnostnou spektrometriou (HPLC-MS) metabolizmus (¹³C) Leu nádorovými bunkovými líniami a vznikajúce metabolity obohatené o ¹³C izotop uhlíka. Na stanovenie expresie MCC, sme tiež použili imunodetekčné metódy, ako Western blot a imunocytochémiu. Okrem toho pomocou analýz s imunohistochemickým značením sme sledovali prítomnosť MCC v homogenátoch z ľudských mozgových nádorov. Výsledky: Výsledky našej metabolickej analýzy poukazujú na to, že nádorové bunky vychytávajú z kultivačného média vo vysokej miere rozvetvené aminokyseliny. Pomocou HPLC-MS sme kvantifikovali, že nádorové bunkové línie metabolizujú ¹³C Leu z média. Okrem toho nádorové bunkové línie uvoľnili do média niekoľko zlúčenín obohatených o atómy ¹³C, ako napríklad 2-oxoizokaproát a citrát. Prítomnosť špecifického enzýmu (MCC) zodpovedného za ireverzibilný metabolizmus Leu, sme detegovali v ľudských nádorových bunkových líniiach astrocytómu, glioblastómu a neuroblastómu. Zároveň pomocou analýzy dot-blot demonštrujeme, že enzým MCC je tiež prítomný v homogenátoch z ľudských mozgových nádorov.

Záver: Nami získané výsledky poukazujú na fakt, že nádorové bunky metabolizujú leucín. Leu je využívaný na proteosyntézu, ale aj ako zdroj aminoskupiny na syntézu aminokyselín a nukleotidov. Súčasne však Leu môže vstupovať do ireverzibilného katabolizmu, kde je zdrojom uhlíkovej kostry pre vznik molekúl acetyl-CoA. Acetyl-CoA sa

môže zapájať nie len do energetického metabolizmu bunky, ale aj na syntézu mastných kyselín, cholesterolu a lipidov (6). Okrem toho acetyl-CoA je substrátom pre rôzne acetylázy v bunke, napríklad pre histón acetylázy, čím môže vplývať na epigenetickú reguláciu génovej expresie. Analogicky je možné predpokladať, že prítomnosť resp. expresia MCC v ľudských mozgových nádoroch využíva Leu ako zdroj acetyl-CoA.

Literatúra:

1. Gondáš E, Kráľová Trančíková A, Majerčíková Z, Pokusa M, Baranovičová E, Bystrický P, Dobrota D, Murín R. Expression of pyruvate carboxylase in cultured human astrocytoma, glioblastoma and neuroblastoma cells. *Gen Physiol Biophys*. 2021 Mar;40(2):127-135.
2. Ericksen R. E., Lim S. L., McDonnell E., Shuen W. H., Vadiveloo M., White P. J., Ding Z., et al. (2019) Loss of BCAA Catabolism during Carcinogenesis Enhances mTORC1 Activity and Promotes Tumor Development and Progression. *Cell Metab*. 29, 1151-1165.e6.
3. Bröer S., Bröer A. (2017) Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J*. 474, 1935–1963.
4. Sperringer J. E., Addington A., Hutson S. M. (2017) Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. *Neurochem. Res*. 42, 1697–1709.
5. Murín, R., Hamprecht, B. Metabolic and Regulatory Roles of Leucine in Neural Cells. *Neurochem Res* 33, 279–284 (2008).
6. Anastasia Krivoruchko, Yiming Zhang, Verena Siewers, Yun Chen, Jens Nielsen, Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering, *Metabolic Engineering*, Volume 28, 28-42, (2015)

PodĎakovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0088 a projektom VEGA 1/0255/20.

Vesnovka obyčajná ako potenciálny zdroj prekursorov izotiokyanátov

Zoltán Polozsányi¹, Michal Kaliňák², Helena Galádová¹, Martin Šimkovič¹

¹ Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

² Centrálna laboratóriá, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Vesnovka obyčajná (*Cardaria draba*) ako druh čeľade *Brassicaceae* je producentom dvoch majoritných glukozinolátov (GLSs) – glukorafanínu a sinalbínu, ktorých hydrolýzou pôsobením myrozináz (β -tioglukozidáz) vznikajú biologicky aktívne zlúčeniny, predovšetkým izotiokyanáty. Je známe, že izotiokyanát sulforafan vznikajúci po hydrolýze glukorafanínu má chemoprotektívne, antikancerogénne a antimikrobiálne účinky. Po chemickej stránke sú izotiokyanáty reaktívne elektrofilné zlúčeniny, čo nám dáva ideu generovať ich in situ a následne sledovať biologický účinok. Náplňou práce bola optimalizácia izolácie intaktných GLSs a separácie individuálnych GLSs z vesnovky obyčajnej, pričom chromatografické techniky sa ukázali byť ako najefektívnejšie. Na identifikáciu a kvantifikáciu sa využili dostupné analytické metódy (Zic-HILIC, NMR a MALDI-TOF). Ukázalo sa, že najviac glukorafanínu je v listoch a kvetoch, pričom najmenej v stonke a koreni. Naopak, zastúpenie sinalbínu bolo najviac v koreňoch, menej v kvetoch a listoch. Výťažky sinalbínu v porovnaní s glukorafanínom boli však dvoj- až štvornásobne vyššie. Neoddeliteľnú súčasť tvorila aj príprava enzýmového preparátu obsahujúci aktívnu myrozinázu. Biologický účinok produktov hydrolýzy sa sledoval na vybraných mikrobiálnych modeloch. Sulforafan vykazoval podobné inhibičné účinky na prokaryotické aj eukaryotické mikrobiálne modely ($IC_{50} = 0,2$ mmol/L). Produkty hydrolýzy sinalbínu nevykazovali žiadne účinky na rast mikroorganizmov, hoci sinalbín rovnako podliehal hydrolýze (úbytok sinalbínu v reakčnej zmesi sledovaný pomocou Zic-HILIC).

Pod'akovanie: Práca bola podporená projektami APVV-16-0439 a ITMS 26230120006.

Ceramidy s krátkym acylovým reťazcom a ich vplyv na leukemické bunky

Lucia Šofranková¹, Boris Lakatoš¹, Katarína Elefantová¹, Albert Breier^{1,2}

¹ Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

² Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko

Sfingolipidy, vrátane ceramidu a sfingozín-1-fosfátu, sú bioaktívne mediátory, ktoré sa podieľajú na dôležitých bunkových procesoch. Regulujú prežívanie i smrť buniek prostredníctvom dynamickej rovnováhy. Ceramidy patria do druhej najväčšej skupiny membránových lipidov. Predstavujú rodinu viac ako 200 štruktúrne príbuzných sfingolipidov. Sú tvorené sfingoidovou bázou a mastnou kyselinou spojenou prostredníctvom amidovej väzby. Ceramid typicky indukuje zastavenie rastu a apoptózu buniek. Jeho fosforylované alebo glykozylované deriváty naopak zohrávajú kľúčovú úlohu v prežití a proliferácii. Intracelulárne hladiny ceramidu sú za normálnych podmienok udržiavané na nízkej úrovni, ale niektoré patologické stavy narušujú metabolizmus ceramidu, čo vedie k jeho akumulácii a poškodeniu buniek. Takéto zvýšenie koncentrácie ceramidu by bolo žiaduce v rakovinových bunkách, v ktorých by mohlo vyvolať programovanú bunkovú smrť. Neoplastické bunky sú však často chránené pred nepriaznivými účinkami ceramidu zvýšenou expresiou alebo aktivitou enzýmov zapojených do premeny ceramidu na menej škodlivé druhy sfingolipidov (1,2).

Cieľom tejto práce bolo zistiť účinok ceramidov s krátkym acylovým reťazcom (C2, C6 a C8) na prežívanie myšacích leukemických buniek L1210. Tento model tvoria tri sublinie: S bunky, ktoré sú P-glykoproteín negatívne a liekovo-senzitívne bunky; R bunky získané selekciou S buniek na vinkristín, liekovo-rezistentné bunky, ktoré exprimujú P-gp, a T bunky, ktoré vznikli transfekciou S buniek génom kódujúcim ľudský P-gp.

Účinnosť exogénne pridávaných ceramidov potlačiť rast buniek L1210 je v smere C6>C8>C2. Ceramidy majú výraznejší vplyv na subliniu S ako na R a T. Pri použití najúčinniejšieho ceramidu C6, pri nami zvolenej najvyššej koncentrácii 30 μ M došlo k poklesu viability na hodnotu < 3 %. Najvyšší účinok ceramidov sme zaznamenali po 18-24 hodinovej inkubácii. Predĺženie doby inkubácie vedie k zvýšenému podielu buniek v G1 fáze. Zásah do metabolizmu sfingolipidov prostredníctvom inhibítorov ceramidázy (n-oleyletanolamín - NOE) a ceramidsyntázy (fumonizín B1 - FB1) v koncentrácii 1 a 10 μ M nemal vplyv na viabilitu buniek. V kombinácii inhibítorov s ceramidmi bol účinnejší FB1 ako NOE, najväčšiu účinnosť dosahoval ceramid C6 o koncentracii 5 μ M, v kombinácii s FB1 o koncentrácii 10 μ M. NOE sa prejavil ako slabý inhibítor a ani v koncentrácii 100 μ M neznížil viabilitu buniek pod 60 %. Inhibítory ceramidázy karmofur a D-eMAPP v koncentrácii 50 μ M majú vysoký cytotoxický účinok na bunky a znížili viabilitu pod 20 %.

Literatúra:

1. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2011) Many ceramides. *Journal of Biological Chemistry*. 286, 27855–27862
2. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2018) Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 19, 175–191

Pod'akovanie: Práca bola podporená z projektov: APVV-14-0334, APVV-15-0303, VEGA 2/0070/19, projektu Výskumnej agentúry ITMS 26230120006.

Denný profil expresie komponentov biogenézy miRNA a prekursorových miRNA pre-miR-30c a pre-miR-34a v suprachiazmatických jadrách hypotalamu, srdci, pečeni a obličkách potkana

Paulína Pidíková, Iveta Herichová

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4, Slovensko

Mikro RNA (miRNA) sú krátke nekódujúce RNA, regulujúce expresiu génov na post-transkripčnej úrovni, cez ich väzbu na cieľovú mRNA. Biogenéza miRNA pozostáva z dvoch krokov. Primárny transkript miRNA je procesovaný ešte v jadre enzýmom Drosha a kofaktorom DGCR8 (DiGeorge critical region 8), pričom vzniká prekursorová miRNA (pre-miRNA). Po transporte do cytoplazmy je pre-miRNA procesovaná enzýmom Dicer [1].

Expresia viacerých miRNA je modulovaná angiotenzínom II (AngII), ktorý je hlavnou výkonnou zložkou renín-angiotenzínového systému (RAS) regulujúceho tlak krvi [2]. Zároveň miRNA podliehajú aj kontrole sprostredkované cirkadiálnym systémom (CS), ktorý generuje endogénne rytmy s približne 24h periódou. Centrálny oscilátor CS je lokalizovaný v suprachiazmatických jadrách hypotalamu (SCN) a cez neurálne a humorálne dráhy koordinuje činnosť periférnych oscilátorov lokalizovaných vo všetkých ostatných tkanivách. Molekulárny mechanizmus generovania cirkadiálnych oscilácií je zložený na koordinovanej expresii hodinových génov *per* a *cry* a transkripčných faktorov CLOCK a BMAL1 [3]. Regulačný vplyv CS na expresiu génov môže byť mediovaný aj prostredníctvom miRNA [4]. Cieľom našej práce bola analýza vplyvu podávania Ang II na 24h profil expresie komponentov biogenézy miRNA *dicer*, *drosha* a *dgcr8*, prekursorových miRNA pre-miR-30c a pre-miR-34a, mRNA hodinového génu *per2* a transkripčného faktora *clock* v SCN, srdci, pečeni a obličkách. V experimente boli použité samce potkana (Wistar, n=54), ktoré boli na začiatku pokusu rozdelené do dvoch skupín. Experimentálnej skupine (AngII) bol podávaný AngII prostredníctvom osmotických minipumpičiek a zvieratá z kontrolnej skupiny (K) podstúpili sham operáciu. Po 28 dňoch infúzneho podávania AngII prebiehal odber tkanív v 4h intervaloch v priebehu 24 h. Z tkanív bola následne vyizolovaná mRNA. Expresia génov bola analyzovaná pomocou real-time PCR a štatisticky vyhodnotená kosínorovou analýzou.

V pečeni sme pozorovali rytmickú expresiu *per2*, *clock*, *dgcr8* a pre-miR-30c v K aj AngII skupine ($P < 0,01$). Podávanie AngII viedlo k indukcii rytmickej expresie pre-miR-34a ($P < 0,05$) a fázovému posunu rytmu dopredu pri expresii *per2* ($P < 0,01$).

V srdci analýza ukázala signifikantný rytmus v expresii *per2* ($P < 0,01$) a *clock* ($P < 0,01$). Expresia *dgcr8* bola rytmická v K skupine ($P < 0,01$), podávanie AngII viedlo k strate rytmicity. Pre-miR-34a vykazovala trend k rytmicite v K aj AngII skupine ($P = 0,08$) a v expresii pre-miR-30c sme pozorovali trend k rytmicite v K skupine ($P = 0,07$) a signifikantný rytmus v Ang II skupine ($P < 0,05$). Po podávaní AngII sa tiež signifikantne znížil mezor rytmu *per2* a nastal jeho fázový posun dopredu ($P < 0,01$).

V obličkách bola signifikantne rytmická expresia *clock*, *per2*, *dgcr8* a pre-miR-30c v K skupine ($P < 0,05$), pričom po podávaní AngII zostal tento rytmus zachovaný len pri *per2* a pre-miR-30c ($P < 0,05$). V Ang II skupine sme tiež pozorovali zvýšenie mezoru rytmu pre-miR-30c ($P < 0,01$). V SCN sme pozorovali signifikantný rytmus v expresii *per2* a to v K aj AngII skupine ($P < 0,01$).

Naše výsledky ukazujú, že z analyzovaných komponentov biogenézy miRNA mal rytmickú expresiu najmä kofaktor DGCR8 v periférnych oscilátoroch, pričom rytmus v obličkách a srdci bol responzívny na AngII. Vplyv AngII bol najvýraznejší v obličkách, kde podávanie AngII bolo asociované so stratou rytmickej expresie clock a dgcr8 a so zvýšením mezoru rytmu v expresii pre-miR-30c. Získané výsledky naznačujú, že vplyv cirkadiálneho systému a RAS na biogenézu miRNA je tkanivovo špecifický a pravdepodobne interaguje s ďalšími regulačnými faktormi.

Literatúra:

- [1] Graves, P. a kol. (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10:239-45
- [2] Adamcova, M. a kol. (2021) The Impact of microRNAs in Renin-Angiotensin-System-Induced Cardiac Remodelling. *Int J Mol Sci.* 22:4762
- [3] Smolensky M.H., a kol. (2017) Circadian mechanisms of 24-hour blood pressure regulation and patterning. *Sleep Med. Rev.* 33:4-16.
- [4] Torres, M. a kol. (2017) Circadian processes in the RNA life cycle. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 9:e1467

PodĎakovanie: Práca bola podporená grantami APVV-16-0209; VEGA 1/0679/19; UK/315/2021

Identifikácia, expresia a funkcia peptidov príbuzných tachykinínu a ich receptorov u kliešť'a *Ixodes ricinus*

Vanda Klöcklerová, Ivana Daubnerová, Ladislav Roller, Dušan Žitňan

Ústav Zoológie, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 84506 Bratislava

Neuropeptidy sú významné signálne molekuly mnohobunkových organizmov fungujúce ako rastové faktory, neuromodulátory, neurotransmitery, hormóny a zúčastňujú sa takých procesov akými je rast, vývoj, ekdýzia, diuréza, trávenie, atď. Natalizíny (NT) a tachykiníny (TK) sú konzervované neuropeptidy pôvodne identifikované u viacerých druhov hmyzu. Natalizíny boli identifikované ako peptidy príbuzné tachykinínom a TK receptor (TKR) 86C muchy *D. melanogaster* bol neskôr popísaný ako NT receptor (NTR). NT u hmyzu zohrávajú úlohu v natalite a plodnosti [1, 2], zatiaľ čo TK sú pleiotropné peptidy s funkciou od regulácie metabolizmu lipidov [3], diurézy [4], modulácie olfaktorického vnímania a pohybovej aktivity [5], a i. Gény kódujúce NT a TK a ich receptory boli identifikované aj u roztoča včiel (*V. destructor*), ale ich funkcia zatiaľ nebola popísaná [6]. V našej práci sme prostredníctvom bioinformatickej analýzy identifikovali gény kódujúce NT a TK a ich receptory u kliešť'a *Ixodes ricinus*. Tk gén kóduje tri príbuzné peptidy, ktorých existenciu sme aj experimentálne overili. Všetky tri peptidy sme následne využili na in vitro charakterizáciu potenciálneho TKR v CHO bunkách. Gén nt kóduje dva NT peptidy, ktoré oba aktivujú jediný NTR. Transkripty nt a tk génov sme lokalizovali metódou hybridizácie in situ a zodpovedajúce neuropeptidy imunohistochémiou v syngangliu/mozgu kliešť'ov. Zároveň sme charakterizovali expresiu NTR a TKR vo viacerých orgánoch kliešť'ov metódou RT qPCR. TKR je exprimovaný najmä v CNS, čreve a ováriách, zatiaľ čo NTR v syngangliu a ováriách a pohlavných orgánoch samcov. Na potlačenie expresie peptidov a receptorov, a s tým spojené určenie ich funkcie, sme využili metódu RNA interferencie.

Literatúra:

- [1] Jiang H., Lkhagva A., Daubnerová I. (2013) PNAS 110 (37), E3526-E3534.
- [2] Gui S.-H., Jiang H.-B., Liu X.-Q. (2017) Insect Mol. Biol. 26(1), 103-112.
- [3] Song W., Veenstra J. A., Perrimon N. (2014) Cell Rep. 9(1), 40-47.
- [4] Skaer N. J. V., Nässel D. R., Maddrell S. H. et al. (2002) J. Exp. Biol. 205(13), 1869-80.
- [5] Winther A. M. E., Acebes A., Ferrús A. (2006) Mol. Cell Neurosci. 31(3), 399-406.
- [6] Jiang H., Kim D., Dobesh S. et al. (2016) Sci. Rep-UK 6(19547), doi:10.1038/srep19547.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 2/0080/18.

Molekulové a katalytické vlastnosti myrozinázy izolovanej z *Lepidium sativum* prostredníctvom celulózového sorbentu s imobilizovaným sulforafanom

Helena Galádová, Zoltán Polozsányi, Martin Šimkovič

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

Kľúčovou zložkou unikátneho obranného systému rastlín voči škodcom je enzým myrozináza, ktorý štiepi tioglykozidovú väzbu v glukozinolátoch za vzniku viacerých toxických produktov, ako sú nitrily, epitionitrily, tiokyanáty, izotiokyanáty a oxazalín-2-tióny (1). Tento enzým sa nachádza v rastlinách z čeľade *Brassicaceae* (2) a v niektorých druhoch hmyzu (3). Enzýmy s myrozinázovou aktivitou sa nachádzajú aj vo vláknitých hubách (4). Spoločne s glukozinolátmi sú súčasťou alelopatických interakcií medzi rastlinami a v dnešnej dobe sa využívajú v ekologickom poľnohospodárstve pri ochrane úžitkových plodín voči rôznym patogénom (5). Najvýznamnejším produktom degradácie sú izotiokyanáty, z ktorých najviac sľubným kandidátom je sulforafan. Je o ňom známe, že svojím pôsobením aktivuje detoxifikačné enzýmy druhej fázy, čím výrazne pomáha pri prevencii a liečbe niektorých druhov rakoviny (6). Táto práca pojednáva o purifikácii myrozinázy z *Lepidium sativum* pomocou špecificky navrhnutom celulózovom nosiči s kovalentne viazaným sulforafanom prostredníctvom trietylaminového ramienka. Súčasne popisuje molekulové a katalytické vlastnosti izolovanej myrozinázy prostredníctvom základných požiadaviek na teplotu a pH, substrátovej špecificity, aktiváciu v prítomnosti kyseliny L-askorbovej a účinku vybraných glykozidázových inhibítorov. Rovnako sme sa s využitím hmotnostnej spektrometrie pokúsili nami izolovaný enzým identifikovať.

Literatúra:

- (1) Halkier, A. B. a kol. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Plant Biol.* 57:303-333 (2006).
- (2) Rask, L. a kol. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant. Mol. Biol.* 42(1):93-113 (2000).
- (3) Beran, F. a kol. Phyllotreta striolata flea beetles use host plant defense compounds to create their own glucosinolate-myrosinase system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(20) (2014).
- (4) Smits, J. P. a kol. Glucosinolate degradation by *Aspergillus clavatus* and *Fusarium oxysporum* in liquid and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 (5), 696-701. (1993).
- (5) Khawar, J. a kol. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection* 72:57-65 (2015).
- (6) Kan, S, a kol. Sulforaphane regulates apoptosis- and proliferation-related signaling pathways and synergizes with cisplatin to suppress human ovarian cancer. *Int J. Mol. Med.* 42(5):2447-2458 (2018).

PodĎakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektov APVV-16-0439, ITMS 26230120006 a grantovej schémy STU na podporu mladých vedecko-výskumných pracovníkov

Ako môže deficit horčíka zasahovať do odpovede buniek na stres endoplazmatického retikula?

Mária Brodňanová¹, Michal Cibulka², Peter Račay¹

¹ *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 03601 Martin*

² *Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 03601 Martin*

Úvod: Stres endoplazmatického retikula (ERS) je považovaný za súčasť patogenézy neurodegeneratívnych, kardiovaskulárnych, metabolických a nádorových ochorení. Do rozvoja a progresie viacerých z týchto chorôb je zapojená aj narušená homeostáza Mg v organizme. Vzájomná interakcia týchto faktorov nemusí byť závislá len na skutočnosti, že jednou zo zásobární Mg²⁺ v bunke je práve ER [1]. Tento druhý najzastúpenejší intracelulárny kation sa totiž zúčastňuje na viacerých ubikvitárnych procesoch, na ktorých ER participuje. V lúmene ER dochádza k N-glykozylácií – dôležitej posttranslačnej modifikácii proteínov. Glykozylácia proteínov je dôležitá nie len pre ich správnu priestorovú štruktúru, ale aj bunkovú lokalizáciu a funkciu. N-glykozylované proteíny sa napríklad zúčastňujú na distribúcii organel, synaptickom prenose, vývine nervového tkaniva, či bunkovej adhézii [2]. Pre štúdium ERS na bunkových a zvieracích modeloch sa často využívajú chemické induktoři tohto stavu. Medzi ne patrí aj tunikamycín (TM) inhibujúci aktivitu eukaryotického enzýmu UDP-N-acetylglukozamín:dolichol-fosfát N-acetylglukozamínfosfotransferáza (GPT), ktorý je kľúčovou súčasťou syntézy oligosacharidového prekursora [3]. Tento prekursor je následne ďalšou enzymatickou reakciou pripájaný na asparagínové zvyšky nascentných polypeptidov. GPT, využíva ako kofaktor ión Mg²⁺ [4], podobne ako stovky ďalších bunkových enzýmov. Napriek nespornému významu Mg pre ľudský organizmus, prijíma tento prvok vo svojej strave v odporúčanej dennej dávke iba 49 % dospeléj americkej populácie [5]. Deficit Mg je vo všeobecnosti podceňovaným rizikovým faktorom mnohých ochorení [6], čoho príčinou môže byť aj nie celkom spoľahlivá metóda posudzovania Mg homeostázy organizmu z koncentrácie celkového Mg v krvnom sére.

Cieľ: Hlavným cieľom našej práce je charakterizovať možný dopad nedostatku horčíka na proces odpovede buniek na ERS vyvolaný inhibítorom N-glykozylácie proteínov.

Metódy: Relatívnu viabilitu buniek HEK293 s regulovanou nadexpresiou génu SLC41A1 (kódujúceho Na⁺/Mg²⁺ výmenník, zodpovedný najmä za vyplavovanie Mg²⁺ z buniek [7]) vystavených experimentálnym podmienkam (2 μmol/L TM, 1 μg/mL tetracyklín a 0 - 3 mmol/L MgCl₂) sme analyzovali kolorimetrickým MTT testom. Morfológické zmeny na bunkách sme sledovali svetelným mikroskopom v režime fázového kontrastu. Na semikvantifikáciu zmien sledovaných proteínov sme použili štandardnú elektroforetickú separáciu s následným western blotom, prípadne kolorimetrickým stanovením obsahu glykoproteínov.

Výsledky: Vplyv TM na zmenu viability buniek je závislý od intracelulárnej koncentrácie Mg²⁺. Po vyčerpaní Mg²⁺ z bunky nedochádza k ďalšiemu znižovaniu prežívania buniek v prítomnosti TM. Bunky na deficit Mg²⁺ v kultivačnom médiu reagujú vytváraním početných zhlukov a čiastočnou stratou kontaktu s povrchom kultivačnej fľaše. Podobné morfológické zmeny pozorujeme aj pri kultivácii buniek v prítomnosti TM. Doposiaľ získané výsledky

z porovnania kvantitatívnych zmien glykoproteómu v študovaných podmienkach nesvedčia o narušenej glykozylnácii v neprítomnosti Mg^{2+} .

Záver: Aktivita kľúčového enzýmu v procese N-glykozylnácie proteínov, využívajúceho Mg^{2+} ako kofaktor, je utlmená kompetitívnym inhibítorom – TM. Narušením tohto procesu dochádza k poklesu bunkovej viability. To však neplatí v podmienkach radikálne zníženej intracelulárnej koncentrácie Mg^{2+} . Naším cieľom preto ostáva bližšie charakterizovať úlohu Mg^{2+} v mechanizmoch zasiahnutých prítomnosťou TM.

Literatúra:

- [1] ROMANI, A.M. Arch Biochem Biophys. 2011; 512(1), 1-23.
- [2] YOO, J. a kol. Nat Struct Mol Biol. 2018; 25(3), 217-224.
- [3] HAKULINEN, J.K. a kol. Nat Chem Biol. 2017; 13(3), 265-267.
- [4] DONG, Y.Y. a kol. Cell. 2018; 175(4), 1045-1058.
- [5] USDA, Agricultural Research Service, 2019; NHANES 2013-2016.
- [6] ISMAIL, A.A.A., Ismail, Y. a Ismail, A.A. QJM, 2018; 111(11), 759-763.
- [7] KOLISEK, M. a kol. Am J Physiol Cell Physiol. 2012; 302(1), C318-C326.

Pod'akovanie: Projekt bol podporený grantom VEGA 1/0277/18.

Prevalencia rezistentných koliformných baktérií v potravinách typu sushi na Slovensku

Monika Krauhlová¹, Klára Cverenkárová¹, Lucia Bírošová¹, Petra Olejníková²

¹ Ústav potravinárstva a výživy, Oddelenie hodnotenia výživy a kvality potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

² Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Úvod: Rozsiahle užívanie antibiotík v humánnej a veterinárnej sfére prispelo k nárastu rezistentných kmeňov baktérií v environmente. Problém šírenia a výskytu rezistencie voči antibiotikám nepozná hranice a potravinový reťazec môže predstavovať transportný medzičlánok rezistentných baktérií a génov rezistencie smerujúcich ku človeku (1). Trendy súčasného stravovania preferujú surové, neopracované potraviny, kam zaradujeme aj potraviny typu „sushi“. Ich mikrobiálna stabilita je položená na hygienických postupoch spracovania. Priamy dôsledok horizontálneho šírenia génov je spojený s prítomnosťou rezistentných patogénov a génov rezistencie v potravinových maticiach, kde sa ku konzumentovi dostávajú prostredníctvom procesu trávenia (2), čo môže viesť k zvýšeniu prevalencie rezistentov v ľudskom mikrobióme. Súčasný vývoj rezistencie u potravinových patogénov je predmetom obáv. Problém rezistencie si žiada interdisciplinárny pohľad, ktorého záverom je koncept označovaný ako „jedno zdravie“ uvedomujúci si blízke prepojenie ľudského zdravia, poľnohospodárstva, zvierat a životného prostredia (3, 4).

Materiál a metódy: Ako vzorky boli použité kúsky rýb z 58 pokrmov sushi, odobraných z 13 prevádzok v Bratislave. Monitorovanými mikroorganizmami boli koliformné baktérie, ktoré boli sledované pomocou Chromocult Coliform agaru (VWR, Nemecko) pri 37 ° C, po dobu 24 hod. Na detekciu rezistentných kmeňov boli do agaru pridané koncentrácie rôznych antibiotík: ampicilín, gentamycín, ciprofloxacín, chloramfenikol (EUCAST, 2020), tetracyklín (CLSI, 2020). Rezistentné bakteriálne kmene boli následne odizolované a identifikované pomocou hmotnostného spektrometra MALDI-TOF (Brucker, Nemecko). U rezistentných izolátov bola následne detegovaná nadprodukcia efluxných púmp prostredníctvom Agar Cartweelovej metódy s použitím etídiumbromidu.

Výsledky a diskusia: Koliformné baktérie sa pohybovali v rozmedzí 0,0 - 4,33 log KTJ/g. Rezistentné baktérie boli prevažne zaznamenané v prípade použitia antibiotika ampicilín. Iba v jednej prevádzke bola zaznamenaná rezistencia voči ciprofloxacínu. V 5 prevádzkach bola detegovaná rezistencia voči gentamycínu. Rezistencia voči tetracyklínu bola zaznamenaná u 10 vzoriek v rozmedzí 1,95 - 3,74 log KTJ/g. V 6 vzorkách sushi rýb neboli detegované celkové ani rezistentné koliformné baktérie. Úspešne sme identifikovali 96 rezistentných koliformných baktérií. Prevažne boli identifikované baktérie rodu *Enterobacter* spp. (40 %) a *Klebsiella* spp. (25 %). Dve baktérie boli identifikované ako *E. coli* odizolované z antibiotických misiek s prídavkom ampicilínu a gentamycínu. Oba rezistentné kmene pochádzali zo vzoriek odobraných z jednej prevádzky. Ďalšie úspešne odizolované a identifikované kmene boli napríklad *Serratia liquefaciens*, *Raoultella* spp., *Cronobacter sakazakii* a ďalšie. Nadprodukcia efluxných púmp bola zaznamenaná u 2 rezistentných kmeňov *E. cloacae*.

Záver: Rezistentné kmene baktérií sa nachádzajú ubikvitne v environmente, nevynímajúc potravinový reťazec. S nárastom záujmu ľudí o zdravý životný štýl rastie aj

záujem o tzv. zdravé potraviny, kam patria aj ryby ako hlavná zložka sushi pokrmov. Bežný konzument si častokrát neuvedomuje možné riziká spojené s konzumom týchto tepelne neopracovaných potravín. Dôkazom je prítomnosť koliformných baktérií *Klebsiella* spp. a *E. coli* vo vzorkách sushi. Keďže problematika rezistencie nepozná hranice môžu tieto potravinové patogény predstavovať zdroj génov rezistencie obohacujúci črevný rezistóm človeka.

Literatúra:

1. SINGH, V. a kol. 2017. In Foodborne Pathogens and Antimicrobial Resistance, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2017, ISBN 9781119139164.
2. FLOREZ-CUADRADO, D. a kol. 2018. DOI:10.1016/bs.afnr.2018.04.004.
3. TIEDJE, J.M. a kol. 2019. DOI:10.1016/S1002-0160(18)60062-1.
4. WHO – FAO – OIE. 2016. A manual for developing national action plans.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204470/9789241549530_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PodĎakovanie: Autori ďakujú za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúre VEGA (1/0464/21), Výskumnej agentúre SR (ITMS 2623012006) a Agentúre pre výskum a vývoj (16-0171).

Glykoprolifácia sér a plazmy vzoriek tehotenskej cukrovky pomocou na lektínoch založenej microarray

Lucia Pažitná¹, Kristína Kianičková¹, Paras Kundalia¹, Zorana Dobrijević², Nikola Gligorijević², Goran Miljuš², Ana Penezić², Dragana Robajac², Miloš Šunderić², Olgica Nedić², Vesna Mandić Marković^{3,4}, Željko Miković^{3,4}, Ognjen Radojičić⁴, Jaroslav Katrlík¹

¹ *Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko*

² *Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), University of Belgrade, 11080 Belgrade, Serbia*

³ *Faculty of Medicine, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia*

⁴ *Gynecology and Obstetrics Clinic "Narodni front", Belgrade, Serbia*

Výskum a diagnostika ochorení neustále postupuje mľľovými krokmi. Jedným z ochorení, ktoré si žiada našu pozornosť je diabetes mellitus. Podľa WHO niektorým z typov cukrovky v súčasnosti trpí približne 422 miliónov ľudľľ a predpokladá sa, že toto číslo bude ďalej narastať [1]. Jedným z typov diabetu je aj gestačný diabetes mellitus (GDM), teda tehotenská cukrovka. Ide o najčastejšie sa vyskytujúcu metabolickú poruchu počas tehotenstva, ktorá po pôrode zvyčajne samovoľne odoznie [2]. Avšak aj napriek tomu ju nemožno brať na ľahkú váhu, pretože so sebou prináša zdravotné komplikácie pre matku aj dieťa nielen počas tehotenstva, ale aj po ňom. V praxi zaužívaným diagnostickým nástrojom je orálny glukózotolerančný test, ktorý je však pomerne zdľľhavý. V záujme skrátenia času diagnostiky a zlepšenia komfortu pacientiek sa neustále hľľadajú nové biomarkery, pomocou ktorých by bolo možné toto ochorenie odhaliť skôr. Ako sľľubné sa javia glykány, zložené cukry zabezpečujúce dôležité úlohy v organizme. Ich zloženie je ovplyvnené rôznymi faktormi, medzi ktoré patrí aj nástup rôznych ochorení. Podľa nedávných štúdií je možné na základe glykánového zloženia sér a plazmy odľľíšiť jedincov s diabetom typu 1 [3]. Aj na základe týchto zistení je možné predpokladať, že glykány majú potenciál indikovať GDM.

V práci sme sa zamerali na porovnanie N-glykánových profilov sér a plazmy tehotných žien s GDM, T1DM a zdravých tehotných žien. Glykánové profily jednotlivých typov vzoriek boli získané metódou na lektínoch založenej microarray [4]. Jednotlivé vzorky boli bezkontaktným spoterom nanosené na microarray substráty. Ako biorozpoznávací prvok boli použité lektíny s rôznou špecificitou, ktoré zabezpečili rozpoznanie širokého spektra štruktúr.

Na základe vyhodnotených dát môžeme konštatovať, že nami použitá metóda je vhodná na sledovanie glykozylačných zmien v sére a plazme vzoriek GDM. Ďalším krokom bude analýza trombocytov a izolovaného fibrinogénu a namerané dáta zo všetkých typov vzoriek budú vzájomne porovnané s cieľom nájsť potenciálne glykánové biomarkery.

Literatúra:

[1] WHO. 2021. Diabetes [cit. 2021-07-29].

[2] Plows et al., 2018. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3342.

[3] Rudman et al., 2019. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Letters*, 593, 1598-1615.

[4] Zámorová et al., 2017. Analysis of changes in the glycan composition of serum, cytosol and membrane glycoprotein biomarkers of colorectal cancer using a lectin-based protein microarray, *Analytical Methods*, 18, 2660-2666.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV DS-FR-19-0034, APP0061 a MESTDRS 451-03-68/2020-14/200019. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre pokročilé terapie chronických zápalových ochorení pohybového aparátu, ITMS: 313011W410, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto publikácia vznikla vďaka podpore OZ Preveda.

Charakterizácia myoinhibičného peptidu a jeho receptorov u kliešťa *Ixodes ricinus*

Matej Medla, Ivana Daubnerová, Juraj Koči, Ladislav Roller, Mirko Slovák, Dušan Žitňan

Ústav zoológie, SAV, Dúbravská cesta 9, 84506, Bratislava, Slovensko

Neuropeptidy sú veľká a mimoriadne rozmanitá skupina signálnych molekúl v mnohobunkových organizmoch. Prostredníctvom väzby na receptory spriahnuté s G proteínmi (GPCR) zohrávajú úlohu neuromodulátorov – sú zapojené do regulácie širokej škály biologických procesov, ako napríklad: príjem potravy, rast, reprodukcia, zvliekanie a cirkadiánnny rytmus. Avšak v dnešnej dobe máme aj napriek pokročilým metódam molekulárnej biológie iba málo vedomostí o identite jednotlivých neuropeptidov, ich funkcii a priebehu expresie vo vektoroch prenášajúcich patogény – kliešťoch *Ixodes ricinus*.

V našej štúdii sme sa zamerali na signálnu dráhu myoinhibičného peptidu (MIP) u *Ixodes ricinus*. Po identifikácii sekvencie MIP sme kódujúci úsek klonovali do pGEM-T vektorov. Nukleotidovú a aminokyselinovú sekvenciu sme použili na návrh *in situ* hybridizačnej próby a špecifickej protilátky na fluorescenčnú imunohistochemiu. MIP sme detegovali predovšetkým v centrálnej nervovej sústave kliešťov – synganglióne, v inervácii slinných žliaz, zadného čreva a pohlavných orgánov. Na základe sekvenčnej homológie u príbuzných druhov sme vyhľadali dva potenciálne GPCR receptory (MIPR1 a MIPR2), ktorých senzitivitu a špecificitu sme detegovali pomocou bioluminiscenčnej receptorovej eseje. Oba receptory boli špecifické a aktivované rádovo v nanomolárnych koncentráciách peptidu. Pomocou kvantitatívnej real-time PCR (qRT-PCR) sme zmerali expresný profil oboch receptorov vo vybraných štádiách kliešťa v tkanivách inervovaných MIP, na základe imunohistochemického farbenia. Na zistenie funkcie MIP signálnej dráhy sme použili metódu RNA interferencie (RNAi).

Podľa výsledkov, predovšetkým z farbenia a RNAi experimentov, naše zistenia napovedajú, že MIP signálna dráha má uplatnenie pri cicaní krvi a je zapojená do regulácie procesov prebiehajúcich v pohlavných orgánoch kliešťov *Ixodes ricinus*.

Kľúčové slová: myoinhibičný peptid, GPCR, *Ixodes ricinus*, RNA interferencia

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-16-0395 a VEGA 2/0080/18.

Štúdium produkcie kyseliny punikovej v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe*

Daniela Krajčiová, Roman Holič

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, CBV SAV, Dúbravská cesta 9, 84005 Bratislava, Slovenská republika

Kyselina puniková (PuA) je súčasťou oleja semien granátovníka (*Punica granatum*) a obyčajne sa používa ako prídavok do kozmetiky a jedla. S pribúdajúcimi štúdiami o pozitívnych vlastnostiach tejto mastnej kyseliny (protinádorové, protiobezitné, protizápalové a protidiabetické) sa zvyšujú globálne požiadavky na jej produkciu [1]. *P. granatum* ako jej hlavný zdroj obsahuje 60 – 80 % (w/w) PuA z celkového množstva oleja. Rastie však iba v tropických oblastiach s obmedzenou výsadbovou plochou. Poškodenie škodcami a klimatické zmeny môžu navyše znížiť výťažnosť oleja z tejto rastliny. Preto je ponuka PuA obmedzená a zaujímavá je jej alternatívna výroba. Mikroorganizmy s rýchlym rastom a jednoduchou kultiváciou sú tak atraktívna voľba pre jej industriálnu produkciu.

PuA je syntetizovaná postupnou premenou kyseliny olejovej (OA) na kyselinu linolovú (LA) a následne PuA. Konverziu OA na LA katalyzuje enzým FAD2 s delta-12 desaturázovou aktivitou. FAD2 konjugáza ďalej konvertuje túto dvojitú väzbu na 2 dvojité väzby v pozíciách 11 a 13. Okrem toho ako bifunkčný enzým zároveň disponuje aj slabou FAD2 aktivitou [2]. Kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* obsahuje až 80 % OA z celkových mastných kyselín a preto je vhodným kandidátom pre produkciu PuA. Heterológnu expresiou PgFAD2 prípadne jeho koexpresiou s PgFAD2 sa podarilo dosiahnuť produkciu PuA na úroveň 19,6 % respektíve 25,1 % z celkového obsahu mastných kyselín [1].

Modifikovaný kmeň produkujúci PuA však vykazuje nižšiu schopnosť rastu ako divý kmeň. Rozhodli sme sa preto urobiť niekoľko experimentov na bližšiu charakterizáciu rastu a viability buniek. Použitím fluorescenčnej mikroskopie sme porovnávali DNA jadrá a septá vybraných kmeňov. Výsledky naznačujú, že znížený rast produkujúceho kmeňa môže súvisieť s poruchami bunkového delenia.

Literatúra:

- [1] Garaiova M., Mietkiewska E., Weselake R. J., et al. (2017) Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(21), p. 7913
[2] Holic R., Xu Y., Caldo K. M. P., et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(8), p. 3537

Pod'akovanie: Práca vznikla vďaka finančnej podpore grantu VEGA 2/0012/20.

The development of new molecular tools for studying senescence-like phenotype in neurons

Kristína Macová, Dominika Fričová

Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84510 Bratislava, Slovakia

Senescence is an important cellular mechanism that prevents the proliferation of damaged and potentially malignant cells. It is usually activated by a persisting presence of DNA damage, reactive oxygen species, strong mitogenic or oncogenic signaling, loss of certain tumor suppressors, mitotic stress or stalled DNA replication (1,2). The long-term existence of these factors in cells threatens the preservation of genome integrity. Therefore, senescence is an essential process for the body's ability to maintain overall health and homeostasis. For a long time, it was believed that this response occurs only in replication-competent cells, due to their limited proliferation capacity. However, recent studies have shown that postmitotic, fully differentiated cells, like neurons, can also initiate a senescence-like phenotype, which includes elevated levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p16^{INK4a} and p21^{Waf-1/Cip1}, increased senescence-associated β galactosidase activity as well as production of various inflammatory molecules (3,4).

Even though senescence works primarily as a tumor-suppressor mechanism, multiple recent studies have suggested that it might also be one of the main causes of aging and a factor influencing the onset and progression of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Despite finding senescence-associated hallmarks in tissues of patients with these conditions, it is not clear yet, whether their elevated levels in neurons are part of pathological processes (2,5). To be able to study the involvement of neuronal senescence-like phenotype in neurodegeneration, we first need to have effective tools.

Our aim is to generate reliable senescence reporters and provide missing tools, that can be used to research the correlation between senescence induced in neurons and neurodegeneration. We will prepare donor DNA constructs containing fluorescence-based tandem-dimer Tomato or a glow-type luminescent luciferase NanoLuc in-between two homology arms. Next, we will employ a CRISPR/Cas9 targeting technique to modify the genome of human neuronal progenitor cells. The generated construct will be inserted into exon 1 of genes encoding p16^{INK4a} or p21^{Waf-1/Cip1} through a homology-directed DNA repair mechanism in cells. With this approach, we will create four different senescence reporters that are highly specific and stable in human neurons.

The growing interest in studying senescence has boosted our knowledge of its role in aging and age-related diseases. Our ultimate goal now is to fully understand the role of senescence in neurodegeneration and also the impact of neuronal senescence-like phenotype on the pathogenesis of diseases. Reporters created in our laboratory will help us explore this newly evolving and exciting part of the neuroscientific field.

Keywords: senescence, neurodegeneration, neurons, reporters, CRISPR/Cas9, p16^{INK4a}, p21^{Waf-1/Cip1}

References:

1. Chinta, S. J., Woods, G., Rane, A., Demaria, M., Campisi, J., Andersen, J. K. (2015). Cellular senescence and the aging brain. *Exp Gerontol.* 68:3–7.
2. Baker, D. J., Petersen, R. C. (2018). Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest.* 128(4):1208–1216.

3. Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tzolou, A., Gonos, E. S., Thrasivoulou, C., Saffrey, M. J., Cameron, K., von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging cell*. 11(6):996–1004.
4. Maciel-Barón, L. Á., Moreno-Blas, D., Morales-Rosales, S. L., González-Puertos, V. Y., López-Díazguerrero, N. E., Torres, C., Castro-Obregón, S., Königsberg, M. (2018). Cellular Senescence, Neurological Function, and Redox State. *Antioxid Redox Signal*. 28(18):1704–1723.
5. Martínez-Cué, C., Rueda, N. (2020). Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*. 14:16.

Acknowledgement: This project was supported by: Grant UK for young scientists UK/137/2021, APVV-19-0585, VEGA2/0158/21

Produkcia rekombinantných enzýmov využívaných v diagnostike COVID-19

Vladimír Krasňan, Tatiana Petrovičová, Zuzana Hegyi, Martin Rebroš

Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Produkcia rekombinantných enzýmov má v súčasnosti široké uplatnenie v mnohých priemyselných odvetviach. Využívané sú najmä ľahko kultivovateľné a nenáročné druhy mikroorganizmov exprimujúce vložený gén cieľového enzýmu. Kľúčovým faktorom pre aplikáciu enzýmov je však dobre zvládnutá veľkokapacitná produkcia a izolácia dostatočného množstva produktu [1,2]. Jedno z odvetví významne využívajúce rekombinantné enzýmy je laboratórna diagnostika rôznych ochorení, momentálne práve prebiehajúca pandémie vírusu COVID-19. Na detekciu koronavírusu sa masívne využíva diagnostika na báze RT-qPCR, schopná zachytiť aj veľmi malé množstvo vírusovej RNA a kvantitatívne ho stanoviť v reálnom čase. Uvedená metóda využíva 2 kľúčové enzýmy – reverznú transkriptázu a Taq polymerázu, pričom prvý enzým prepíše vírusovú RNA do komplementárnej cDNA a tá je následne pomnožená pomocou Taq polymerázy. Prebiehajúca pandémie spôsobila vysoký dopyt po uvedených enzýmoch a ich prípadných alternatívach, schopných skrátiť a zefektívniť toto stanovenie.

Táto práca využíva na produkciu rekombinantnú baktériu *E. coli* schopnú rásť do vysokých bunkových hustôt a zároveň exprimovať žiadané enzýmy v dostatočnom množstve [3, 4]. Cieľom práce je optimalizácia produkcie oboch enzýmov v minibioreaktoroch a následný up-scale do vyšších objemov zabezpečujúcich dostatočné výťažky aj produktivity procesov.

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.

Pod'akovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Bola tiež podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. PP-COVID-20-0056.

Extracellular maltooligosaccharide-forming amylase from *Pseudomonas* sp. strain MPA-2

Mária Bláhová, Helena Hronská, Michal Rosenberg

Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Maltooligosaccharides are oligosaccharides composed of 3 to 10 α -glucose monomers linked by α -1,4 glycosidic linkage. They attract a lot of attention thanks to their typical features. They are low-calorie sweeteners with water-holding capacity and can inhibit the crystallization of sucrose what makes them useful in food processing [1,2]. There is increasing demand for them in pure form for more specific use in the pharmaceutical industry and therefore there is a requirement for their production in this manner. One possible production involves the use of an enzyme maltooligosaccharide-forming amylase.

Maltooligosaccharide-forming amylases (MFAses) can produce maltooligosaccharides as the final product from starch or other related α -1,4 glucans. MFAses are a group of enzymes that include maltotriose-forming amylases, maltotetraose-forming amylases, maltopentaose-forming amylases, and maltohexaose-forming amylases, and together they belong to the class of hydrolases. MFAses can be roughly classified into two groups based on their actions. The one is an exo-type MFAses that hydrolyzes amylaceous compounds to remove successive maltooligosaccharide units from the non-reducing chain ends and the other is an endo-type MFAses that acts on internal amylaceous saccharide chains to produce maltooligosaccharides in a relatively large quantity [1].

As part of our work, strain MPA-2 showed higher maltohexaose-forming amylase activity with a 27% yield of maltohexaose after 48 hours of maltodextrin hydrolysis under our experimental conditions. The synthesis efficiency was influenced by the selection of culture medium, the dextrose equivalent value of the substrate, and the temperature of the reaction mixture.

References:

- [1] PAN, Sihui, et al. Maltooligosaccharide-forming amylase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 2017, 35.5: 619-632.
- [2] SIM, Lyann, et al. Human intestinal maltase–glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of molecular biology*, 2008, 375.3: 782-792.

Acknowledgement: This work was supported by the grant APVV-20-0208.

Rekombinantná produkcia a kaskádová aplikácia enzýmov lipoxygenázovej dráhy

Veronika Kazimírová, Vladimír Krasňan, Martin Rebroš

Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Cis-3-hexenal a jeho stabilnejší izomér trans-2-hexenal patria medzi cenné látky využívané hlavne v potravinárstve a parfumérii. Sú produkované v rámci lipoxygenázovej dráhy rastlín, do ktorej patria dva enzýmy: lipoxygenáza (LOX) a hydroperoxid lyáza (HPL). Aplikácie tejto dráhy sú však limitované, pričom jedným z hlavných dôvodov je nestabilita HPL. Tento enzým patrí medzi cytochrómy P450 a pre svoju katalytickú funkciu potrebuje prostetickú skupinu hém. Ten musí byť efektívne syntetizovaný v rámci metabolizmu hostiteľského mikroorganizmu

V tejto práci bola LOX z *Pseudomonas aeruginosa* exprimovaná v *Escherichia coli* BL21(DE3) a vo forme celobunkového katalyzátora bola aplikovaná na produkciu kyseliny 13(S)-hydroperoxy-(Z,E,Z)-9,11,15-oktatriénovej (13-HPOT), ktorá je substrátom pre HPL. HPL z *Psidium guajava* bola exprimovaná v *E. coli* JM109(DE3) autoindukčným spôsobom, pričom kľúčovou časťou práce bolo štúdium vplyvu prídavkov prekursorov hému do kultivačného média. Celková produkcia aktívnej HPL bola následne vylepšená zvýšením teploty počas expzie, pričom v optimalizovanom procese bola produktivita približne 14 krát vyššia v porovnaní s pôvodným protokolom.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0254. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2)“, Kód ITMS2014+: NFP313011ASS8, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Detekcia protilátok voči aberantným glykánom

Anna Blšáková, Filip Květoň, Lenka Lorencová, Ján Tkáč

Chemický ústav, SAV, 845 38, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava-Karlova Ves

Glykány sú základnou súčasťou všetkých živých organizmov. Pri dysfunkcií šaperónu COSMC v procese glykozylácie dochádza k poklesu aktivity T – syntázy, čo má za následok expresiu aberantných glykánov [1] Tn - antigénu (GalNAc-O-Ser/Thr), T - antigénu (Gal β -3GalNAc α -O-Ser/Thr), sTn - antigénu (NeuAc α 2-6GalNAc α -O-Ser/Thr). Antigény sú potvrdenými biomarkermi pri mnohých rakovinových ochoreniach [2] ako rakovina prsníka, pľúc [3], prostaty [4], pankreasu [5] a vaječníkov [6]. Imunitný systém reaguje na prítomnosť aberantných glykánov vytvorením autoprotilátok. Štúdie ukazujú, že autoprotilátky sa vyskytujú v krvi ešte pred klinickými príznakmi ochorenia.

V práci sme pripravovali glykánový biosenzor na detekciu protilátok voči aberantným glykánom. Elektrochemické metódy v kombinácii s nanomateriálmi prinášajú mnohé výhody ako miniaturizáciu, časovú a cenovú efektívnosť, nízku medzu detekcie (až na atomolárnu úroveň), vysokú presnosť a vysokú špecifickosť [7]. V práci sa zaoberáme optimalizáciou rozličných parametrov štandardnej a magneto - ELISA metódy. Magneto – ELISA test je kombináciou separácie analytu zo vzorky pomocou magnetických častíc a princípu nepriamej ELISA metódy. Magnetické častice, potiahnuté antigénom boli využité ako pevná fáza na následné meranie koncentrácie imunoglobulínov. Separácia analytu z komplexných vzoriek napomáha obohatiť vzorku pred kvantitatívnou detekciou a tak pomáha znížiť limit detekcie merania.

Literatúra:

1. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, Willard MT, Wang W, Xia JY, Zuna RE, Laszik Z, Benbrook DM, Hanigan MH, Cummings RD. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res.* 2008 Mar 15;68(6):1636-46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2345. Erratum in: *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):3076. PMID: 18339842
2. Hakomori SI, Cummings RD. Glycosylation effects on cancer development. *Glycoconj J.* 2012 Dec;29(8-9):565-6. doi: 10.1007/s10719-012-9448-4. PMID: 22996057
3. Dai L, Tsay JC, Li J, Yie TA, Munger JS, Pass H, Rom WN, Zhang Y, Tan EM, Zhang JY. Autoantibodies against tumor-associated antigens in the early detection of lung cancer. *Lung Cancer.* 2016 Sep;99:172-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.07.018. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27565936
4. Scott E, Munkley J. Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 19;20(6):1389. doi: 10.3390/ijms20061389. PMID: 30893936; PMCID: PMC6470778
5. Dobrochaeva K, Khasbiullina N, Shilova N, Antipova N, Obukhova P, Ovchinnikova T, Galanina O, Blixt O, Kunz H, Filatov A, Knirel Y, LePendou J, Khaidukov S, Bovin N. Specificity of human natural antibodies referred to as anti-Tn. *Mol Immunol.* 2020 Apr;120:74-82. doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.005. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32087569
6. Zaenker P, Gray ES, Ziman MR. Autoantibody Production in Cancer—The Humoral Immune Response toward Autologous Antigens in Cancer Patients. *Autoimmun Rev.* 2016 May;15(5):477-83. doi: 10.1016/j.autrev.2016.01.017. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26827909
7. Kveton, F., et al., A graphene-based glycan biosensor for electrochemical label-free detection of a tumor-associated antibody. *Sensors (Switzerland)*, 2019. 19(24)

Pod'akovanie: Autori ďakujú za finančnú podporu z projektu APVV 17-0300.

Rekombinantné polymerázy využiteľné v diagnostike vírusových ochorení.

Tatiana Petrovičová, Vladimír Krasňan, Zuzana Hegyi, Martin Rebroš

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

Vývoj v oblasti molekulárnych metód priniesol revolúciu v detekcii a charakterizácii mikroorganizmov v mnohých medicínskych diagnostických oblastiach vrátane virológie. Jednou z týchto metód je polymerázová reťazová reakcia (PCR), ktorá je v súčasnosti s reverznou transkripciou štandardným spôsobom diagnostiky vírusu SARS-CoV-2 [1]. Vzhľadom na povahu genetickej informácie vírusu je nevyhnutnou súčasťou tohto procesu enzým reverzná transkriptáza ako aj Taq polymeráza. Nakoľko genetický materiál koronavírusu tvorí jednovláknová RNA, v prvom kroku je potrebná jej konverzia na cDNA reverznou transkripciou. cDNA následne slúži ako templát pre PCR amplifikačnú reakciu, pričom počas reakcie sa fluorescenčný signál zvyšuje so zvyšujúcim sa počtom kópií DNA [2].

Rekombinantná produkcia reverznej transkriptázy a Taq polymerázy poskytuje neobmedzené množstvo enzýmov a zároveň molekulárne techniky umožňujú úpravu ich aktivity, stability a špecificity. Na dosiahnutie potrebnej čistoty enzýmov, ktorá je nevyhnutná pri použití v diagnostických kitoch sa využívajú filtračné a chromatografické techniky. Taktiež stabilizácia aktivity enzýmov je jedným z kľúčových krokov pre ich následné využitie.

Cieľom tejto práce je optimalizácia spracovania rekombinantných polymeráz exprimovaných v hostiteľskom kmeni *Escherichia coli* BL21(DE3). Intracelulárne naprodukované proteíny sú podrobené downstream procesom a následne je testovaná ich aktivita prostredníctvom RT-PCR reakcií.

Literatúra:

- [1] Kevadiya, B.D. , Machhi, J., Herskovitz, J. et al., Diagnostics for SARS-CoV-2 infections, Nat. Mater. 20 (2021) 593–605.
- [2] Chandra, P., Roy, S. eds., Diagnostic Strategies for COVID-19 and other Coronaviruses, Springer Singapore, 2020, ISBN 978-981-15-6005-7.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Bola tiež podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. PP-COVID-20-0056.

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
Postery

Produkcia dypB peroxidázy v expresnom systéme *Vibrio natriegens*

Kristína Alföldiová¹, Ľubica Kormanová¹, Matúš Prívar¹, Eva Struhárňanská¹,
Stanislav Stuchlík^{1,2}

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko

² Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovensko

Súčasná pozornosť v oblasti heterologickej expresie proteínov je venovaná nemodelovému prokaryotickému organizmu *Vibrio natriegens*, morskej gram-negatívnej baktérii z čeľade *Vibrionaceae*, ktorá bola po prvýkrát izolovaná zo slaniska na ostrove Sapelo v štáte Georgia [1]. Zvýšený záujem vyplýva z viacerých produkčných benefitov tohto organizmu v podobe kultivovateľnosti na širokej škále ekonomicky dostupných uhlíkových substrátov, nepatogénneho charakteru a predovšetkým vo výnimočne krátkej generačnej dobe, ktorá pri optimálnych podmienkach predstavuje 9,8 min [2]. V prípade baktérie *E. coli*, ktorá je považovaná za „zlatý štandard“ pre genetické a metabolické inžinierstvo, je generačná doba v energeticky bohatom médiu približne 20 minút [3]. Baktéria *V. natriegens* má práve vďaka spomínaným výhodám, vedúcim k zlepšeniu ekonomiky financií a času, veľký potenciál uplatnenia v biotechnologickom priemysle.

Dyp-type peroxidázy predstavujú pomerne mladú rodinu hémových peroxidáz. Zaujímavou je ich schopnosť oxidácie viacerých organických látok, ktorých spracovanie prostredníctvom iných skupín peroxidáz je problematické a málo účinné. Súčasná štúdia poukazuje na kľúčovú úlohu Dyp-type peroxidáz pri degradácii lignínu, čo z nich robí vhodných kandidátov pre rôzne biokatalytické aplikácie. Objekt nášho záujmu, dypB peroxidáza, bola prvýkrát identifikovaná v kmeni RHA1 baktérie *Rhodococcus jostii*. Vykonané funkčné štúdie založené na spektroskopických analýzach preukázali lignín-degradačnú schopnosť tejto baktérie a taktiež zvýšenie tejto aktivity za prítomnosti Mn^{2+} [4].

V rámci našej práce sme využili baktériu *V. natriegens*, konkrétne modifikovaný kmeň $\Delta vnp12$ pri produkcii peroxidázy dypB pri rôznych teplotných podmienkach. Genóm spomínaného kmeňa je špecificky odstránenými profágovými regiónmi za účelom zníženia stresových podmienok vedúcich k poškodeniu DNA, ktoré môže viesť ku strate produkčných buniek a v konečnom dôsledku k nižšiemu výťažku cieľového proteínu. Súčasťou našej práce je taktiež porovnanie výsledkov analýzy expresie s využitím *V. natriegens* a *E. coli* ako hostiteľskej platformy.

Literatúra:

- [1] Payne, WJ., et al. 1961. Ant. van Leeuwenhoek J. of Microbiol and Ser. 27: 121-128
- [2] Hoffart, E., Grenz, S., Lange, J., Nitschel, R., Müller, F., Schwentner, A., Feith, A., Lenfers-Lücker, M, Takors, E., Blombach, B. 2017. Appl. and Env. Microbiol 83: 14-17
- [3] Gibson, B., Wilson, DJ., Feil, E., Eyre-Walker, A. 2018. Proc. of Royal Soc. B: Biol Sciences 285: 1880
- [4] Mark, A., Roberts, JN., Hardiman, EM., Singh, R., Eltis, LD., Bugg, TDH. 2011. Biochemistry 50: 5096–5107

PodĎakovanie: Tento príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV (APVV-17-0333 a APV-17-0570) a ERDF projektom: SmartFarm (No. ITMS2014: 313011V465).

Charakterizácia rekombinantnej bakteriálnej lignín-peroxidázy

Miroslav Dolník¹, Matúš Prívar¹, Eva Struhárňanská¹, Stanislav Stuchlík²

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko*

² *Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovensko*

Vysoký dopyt po peroxidázach zvyšuje potrebu hľadania nových peroxidáz pre priemyselné využitie. Novou rodinou sú peroxidázy typu DyP, ktoré boli prvýkrát izolované v roku 1999 [1], ale ako samostatná rodina boli klasifikované až od roku 2007 [2]. DyP peroxidázy alebo „dye-decolorizing peroxidase“ získali svoj názov vďaka schoposti degradovať a odfarbovať široké spektrum antrachinónových a azo farbív. Ako prostetickú skupinu obsahujú hém B, podobne ako v prípade chrenovej peroxidázy a lignínovej peroxidázy. Od tradičných peroxidáz sa odlišujú molekulárnou hmotnosťou a najmä substrátovou špecificitou.

Aktivita bakteriálnych DyP voči lignínu bola prvýkrát zaznamenaná u peroxidázy DyPB z *Rhodococcus jostii* RHA1, čo bolo doteraz známe iba u lignínovej peroxidázy a mangánovej peroxidázy pochádzajúce z húb [3]. Pri tomto procese sú Mn²⁺ ióny dôležitým oxidačným mediátorom a bez nich by lignocelulóza nebola metabolizovaná, podobne ako u mangánových peroxidáz. Vplyvy iných iónov na aktivitu peroxidázy DyPB doteraz neboli študované. Bakteriálne DyP peroxidázy majú veľký potenciál pri konverzii lignínu na využiteľné chemikálie, využitie v priemysle na spracovanie dreva, pri produkcii biopalív a pri výrobe papiera.

Cieľom tejto práce je charakterizovať rekombinantnú DyPB z *Rhodococcus jostii*. Zamerali sme sa na štúdium vplyvu rôznych iónov na špecifickú aktivitu peroxidázy a určenie Reinheitszahl (RZ) hodnoty rekombinantného enzýmu.

Literatúra:

[1] Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1029-1035.

[2] Sugano, Y. et al. (2007). *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36652-36658.

[3] Ahmad, M. et al. (2011). *Biochemistry*, 50(23), 5096-5107.

Pod'akovanie: Výskum bol podporený projektami APVV-17-0333 a APVV-19-0196 a projektu SMARTFARM (ITMS2014:313011V465) na základe podpory operačného programu Výskum a inovácie financovaného z ERDF.

Elektrická pulzná stimulácia ako *in vitro* model cvičenia a jej vplyv na ultraštruktúru buniek a formovania nervovosvalovej platničky v diferencovaných ľudských svalových bunkách.

Klára Gabrišová¹, Tímea Kurdiová¹, Marta Novotová¹, Katarína Rerková^{1,2}, Jozef Ukropec¹, Barbara Ukropcová^{1,2}

¹ *Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika*

² *Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika*

Úvod: Cvičenie má pozitívny efekt na metabolické zdravie. Pravidelné cvičenie sa spája s adaptačnými zmenami na úrovni buniek kostrového svalu, a molekulárne mechanizmy v ich pozadí doteraz nie sú úplne objasnené. Pri skúmaní mechanizmov adaptácie na cvičenie využívame kultúry satelitných buniek kostrového svalu. Na vyvolanie kontrolovaných opakovaných kontrakcií v kultúre diferencovaných ľudských svalových buniek využívame elektrickú pulznú stimuláciu (EPS). Naším cieľom bolo overiť účinnosť elektrickej pulznej stimulácie v podmienkach *in vitro* na primárnych kultúrach ľudských svalových buniek so zameraním na ultraštruktúru diferencovaných svalových buniek, expresiu génov a proteínov vyskytujúcich sa v priebehu genézy nervovosvalovej platničky.

Materiál a metódy: Primárne ľudské svalové bunky pochádzajúce od zdravých, chudých mužov ($n = 3$; vek = 31 ± 4 rokov; BMI = $23,3 \pm 2,4$ kg/m²) boli po 6-tich dňoch diferenciácie vystavené elektrickej pulznej stimulácii (Ionoptix, USA) po dobu 24 hodín (1 Hz, 2 ms a 11,5 V). Zmeny v ultraštruktúre diferencovaných svalových buniek sme sledovali pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie, a expresiu vybraných génov spojených so vznikom nervovo-svalovej komunikácie a markerov špecifických typov svalových vlákien sme stanovili metódou RT-PCR. Zmeny v obsahu proteínu, ktorý sa podieľa na vzniku nervovosvalovej platničky, sme merali western blotom.

Výsledky: Po elektrickej pulznej stimulácii sme v diferencovaných bunkách kostrového svalu pozorovali prítomnosť veľkých denzných mitochondrií v tesnej blízkosti drsného sarkoplazmatického retikula. Zvýšená aktivita plazmatickej membrány sa prejavovala zvýšeným výskytom kaveol. Okrem toho sme pozorovali fúziu kaveol bunkovej membrány s drobnými vezikulami, zakladanie membránového a tubulárneho systému, a prítomnosť myofilamentov organizujúcich sa do pozdĺžnych zväzkov s viditeľnými oblasťami tvoriacich sa Z-línií. Elektrická pulzná stimulácia mala tendenciu zvýšiť génovú expresiu MYH1 (marker rýchlych glykolytických svalových vlákien typu IIX ($p < 0,1$), kým expresie MYH2 (marker rýchlych oxidatívnych vlákien typu IIA) a MYH7 (marker pomalých oxidatívnych vlákien typu I) neboli stimuláciou ovplyvnené. Myotuby vystavené elektrickej stimulácii sa vyznačovali zvýšenou expresiou génov pre NCAM1 (Neural cell adhesion molecule, CD56), molekulu zapojenú do medzibunkovej adhézie/komunikácie ($p < 0,05$), a 50 % zvýšenie sme pozorovali aj pri expresii cytoplazmatického adaptorového proteínu Dok7, ktorý je esenciálny pre vznik nervovosvalovej platničky. Avšak expresia génov NT3 (neurotrofín 3) a MUSK (svalovo špecifická tyrozín kináza) podieľajúcich sa na neurogenéze a tvorbe nervovosvalovej platničky nebola zmenená.

Záver: Myotuby vystavené elektrickej stimulácii sa vyznačovali prebiehajúcou myogenezou so zakladaním membránového systému a kontraktilných jednotiek, so zvýšenou expresiou génov pre rýchly, glykolytický typ svalu, ako aj niektorých génov potrebných pre tvorbu medzibunkových interakcií, či formovanie nervovosvalovej platničky. Tieto pozorovania naznačujú, že EPS môže stimulovať medzibunkovú komunikáciu s cieľom zefektívniť kontrakčnú kapacitu v kultúre svalových buniek, a môže byť užitočným nástrojom pre štúdium fyziológie cvičenia.

Pod'akovanie: Práca bola podporená grantami APVV 15/0253, MZCR NU21-05-00322, SAS-MOST JRP 2018/10, VEGA 2/0107/18, VEGA 2/0091/19.

Produkcia termostabilnej katalázy-peroxidázy AfkatG vo *Vibrio natriegens*

Ľubica Kormanová¹, Viktor Varga¹, Andrej Minich¹, Júlia Šarkanová², Eva Struhárňanská¹, Zdenko Levarski², Stanislav Stuchlík¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko

² Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovensko

Baktéria *Vibrio natriegens* bola po prvý raz izolovaná z brakických vôd ostrova Sapelo [1]. Ide o nepatogénnu baktériu, ktorá je významná predovšetkým extrémne krátkou dobou delenia, ktorá sa za optimálnych podmienok pohybuje na úrovni ~ 10 min. To je o polovicu kratší čas ako bol nameraný u najrýchlejšie rastúceho, modifikovaného kmeňa *E. coli* NEB Turbo [2]. *V. natriegens* spĺňa základné biotechnologické charakteristiky a je kompatibilná so základnými technikami rekombinantných DNA. Tieto skutočnosti a nepopierateľné podobnosti s výhodnými vlastnosťami *E. coli* predurčujú túto platformu na jej priame využívanie ako nového alternatívneho produkčného hostiteľa.

Kataláza-peroxidáza AfkatG bola prvýkrát izolovaná z hypertermofilného archeónu *Archaeoglobus fulgidus*. Rovnako bola popísaná a charakterizovaná z pohľadu základnej štruktúry a prítomných aktivít ako kataláza-peroxidáza [3]. Katalázy-peroxidázy nachádzajú využitie v celom spektre priemyselných odvetví. Hypertermofilné vlastnosti enzýmu AfkatG poskytujú nové možnosti aplikácie tohto enzýmu práve z pohľadu zvýšených nárokov pri procesoch s vyššou teplotou. Napríklad pri odstraňovaní zvyškov peroxidu vodíka, ktorý sa často využíva ako dezinfekčné činidlo pri rôznych druhoch priemyselnej výroby. Ďalšou zaujímavou aplikáciou je využívanie AfkatG ako suplementačného činidla do rastových médií pri fermentácii potravinárskych kmeňov mliečnych baktérií ako prevenciu voči patogénom, ktoré sa pri tomto type potravinárskej výroby často vyskytujú. Prídavok AfkatG do rastového média neovplyvňuje rast žiadúcich kmeňov baktérií [4].

V práci sme demonštrovali využitie hostiteľskej platformy *V. natriegens* pri heterologickej produkcii katalázy-peroxidázy AfkatG. Zamerali sme sa na optimalizáciu produkcie z pohľadu teplotných podmienok, vhodných kultivačných médií, či vhodného produkčného kmeňa *V. natriegens*. Najvýhodnejšiu produkciu sme vybrali z pohľadu najvyššieho výťažku solubilnej frakcie proteínu, pričom výsledný produkt mal zachovanú katalázovú aj peroxidázovú aktivitu.

Literatúra:

- [1] Payne, W. J. et al. (1961). Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology. 27: 121-128.
- [2] Long, C. P., Gonzalez, J. E., Cipolla, R. M., Antoniewicz, M. R. (2017) Metabolic Engineering 44: 191-197.
- [3] Kengen, S. W., Bikker, F. J., Hagen, W. R., de Vos, W. M., van der Oost, J. (2001) Extremophiles. 5: 323-32.
- [4] Struhárňanská, E., Chovanová, M., Rybecká, S., Mikulášová, M., Levarski, Z., Zámocký, M., Stuchlík, S., Turňa, J. (2019) Gen Physiol Biophys. 38:455-460.

Pod'akovanie: Výskum bol podporený projektmi APVV (APVV-17-0333 a APVV-17-0570) a ERDF projektom: SmartFarm (No. ITMS2014: 313011V465).

Stanovenie optimálnych expresných podmienok pre alkoholdehydrogenázu z *Rhodococcus ruber*

Viktor Varga¹, Ľubica Kormanová¹, Andrej Minich¹, Júlia Šarkanová², Zdenko Levarski², Stanislav Stuchlík¹

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko*

² *Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovensko*

Nevýhodou enzýmov býva ich nízka stabilita pri nepriaznivých priemyselných podmienkach, akými sú vysoká teplota, prítomnosť denaturujúcich látok a organických rozpúšťadiel. Termostabilné enzýmy sú schopné vykazovať stabilitu pri vysokej teplote, tlaku a vyšších koncentráciách denaturantov [1,2]. Tieto vlastnosti môžu predstavovať dôležitú úlohu v procesoch biotransformácií, pri ktorých dokážeme pomocou enzýmu získavať z menej využiteľných chemických zlúčenín omnoho vzácnejšie a dôležitejšie látky pre viaceré druhy priemyslu (napr. potravinársky alebo kozmetický). Ďalšou výhodou integrácie enzýmov do výrobných procesov stále väčšieho množstva produktov je okrem zníženia výrobných nákladov, prípadne zvýšenia ceny produktu či zjednodušenia výrobného procesu aj eliminácia chemických procesov a ich nahradenie biologickými („zelenšími“) spôsobmi výroby.

Termostabilný proteín alkoholdehydrogenáza z *Rhodococcus ruber* (RrADH) je kľúčovým enzýmom v reverzibilnej konverzii sekundárnych alkoholov a ich príslušných ketónov a aldehydov [3]. Pri produkcii niektorých proteínov je však dosiahnutie solubilnej zložky veľmi obtiažne. Proteíny majú po expresii tendenciu padať do tzv. inklúzných teliesok, čo je nesolubilná (a v najčastejších prípadoch aj neaktívna) forma proteínu.

Našou úlohou bolo určiť základné podmienky pre kultiváciu a následnú expresiu aktívneho proteínu v baktériách *E. coli* pre zabezpečenie aktívneho enzýmu v relatívne dostatočnom množstve s následnou aplikáciou do biotransformácií acetofenónu na 1-fenyletanol.

Literatúra:

[1] FAGAIN O. *Biochim Biophys Acta*. 1995,1252: 1 – 14.

[2] SAQIB A. A. N. & SIDDIQUI K. S. *Biochem Mol Biol Edu*. 2018, 46: 398 – 402.

[3] SOLANSKI K., ABDALLAH W. & BANTA S. *Biotechnol J*. 2016,11: 1483 – 1497

PodĎakovanie: Výskum bol podporený projektmi APVV (APVV-17-0333 a APVV-17-0570) a ERDF projektom: SmartFarm (No. ITMS2014: 313011V465).

Cielená evolúcia exprimovanej alkoholdehydrogenázy RrADH-A s dôrazom na zvýšenú solubilitu

Andrej Minich¹, Ľubica Kormanová¹, Viktor Varga¹, Júlia Šarkanová², Zdenko Levarski², Stanislav Stuchlík¹

¹ *Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko*

² *Univerzita Komenského v Bratislave, Vedecký park, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovensko*

Produkcia proteínov technikami rekombinantnej DNA je populárna v biotechnologickom priemysle a rovnako v biomedicínskom výskume. Avšak iba štvrtina cieľových proteínov je rozpustná a je možné ich purifikovať [1]. V súčasnosti je prezentovaných už mnoho stratégií, ktoré poskytujú riešenie týchto komplikácií. Ide predovšetkým o prístupy proteínového inžinierstva, ako napríklad cielená evolúcia pomocou racionálneho dizajnu, použitie fúzy partnerov s vylepšením rozpustnosti a podobne [2]. Cielená evolúcia sa ukazuje ako účinný nástroj pre priemyselné, výskumné a terapeutické aplikácie [3]. Rýchly vývoj metód na poli *in silico* analýzy štruktúry proteínu ponúka množstvo počítačových nástrojov cielennej evolúcie, ktorými vieme efektívne analyzovať miesta proteínov pre mutagenézu. Tým môžeme zlepšiť ich základné vlastnosti ako solubilita alebo aktivita či termostabilita a zabrániť procesu agregácie proteínov počas heterologickej exprese *in vitro* [4]. Jedným z takýchto nástrojov je aj Aggrescan 3D 2.0, založený na analýze proteínovej sekvencie v kombinácii so štrukturálnymi fyzikálnymi vlastnosťami v natívnych stavoch. A3D pri prepočtoch zahŕňa informácie o 3D proteínových štruktúrach a hodnotí vplyv miest vystavených do prostredia podliehajúcich agregácii [5].

V práci sme sa venovali cielennej evolúcii RrADH-A. Enzým ADH-A z *Rhodococcus ruber* je zodpovedný za mnohé katalytické reakcie, toleruje organické rozpúšťadlá a preto je významným biokatalyzátorom pre asymetrickú syntézu organických zlúčenín. Pomocou nástroja Aggrescan 3D 2.0 sme analyzovali vysoko agregáčnejšie miesta proteínu. Pomocou miesta špecifickej PCR sme vniesli vytipované zámenny do génu proteínu a podarilo sa nám dvojnásobne zvýšiť solubilitu proteínu a rovnako sme dokázali pozitívne ovplyvniť základné vlastnosti kinetiky enzýmovej reakcie ADH-A, čo môže mať pozitívny efekt pri komerčnej produkcii Enzým ADH-A z *R. ruber*.

Literatúra:

[1] Bhandari BK, Gardner PP, Lim CS (2020). *Bioinformatics* 36 (18): 4691 - 4698.

[2] Makino T, Skretas G, Kang TH, Georgiou G (2011). *Metabolic engineering*, 13(2): 241-251.

[3] Packer M, Liu D (2015). *Nat Rev Genet.* 16: 379–394.

[4] Wu Z, Jennifer Kan SB, Lewis RD, Wittmann BJ, Arnold FH (2019). *PNAS USA* 116 (18): 8852-8858.

[5] Pujols J, Pena-Diaz S, Ventura S (2018). *Methods Mol. Biol.* 1762: 427–443.

Podakovanie: Tento príspevok je výsledkom realizácie projektov APVV (APVV-17-0333 a APV-17-0570) a ERDF projektom: SmartFarm (No. ITMS2014: 313011V465).

Odborná komisia - kontakty

1.	Mgr. Mária Balážová, PhD.	maria.balazova@savba.sk
2.	RNDr. Imrich Barák, DrSc.	imrich.barak@savba.sk
3.	prof. Ing. Albert Breier, DrSc.	albert.breier@stuba.sk
4.	doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.	boris.lakatos@stuba.sk
5.	doc. RNDr. Jan Malínský, Ph.D.	jan.malinsky@iem.cas.cz
6.	doc. Ing. Petra Olejníková, PhD.	petra.olejnikova@stuba.sk
7.	prof. RNDr. Peter Račay, CSc.	racay@jfmed.uniba.sk
8.	doc. Ing. Martin Rebroš, PhD.	martin.rebros@stuba.sk
9.	doc. RNDr. Stanislav Stuchlík, CSc.	stanislav.stuchlik@uniba.sk
10.	Ing. Zdena Sulová, DrSc.	zdena.sulova@savba.sk
11.	RNDr. Dušan Žitňan, DrSc.	dusan.zitnan@savba.sk

Sponzori Drobnicovho memoriálu



DROBNICOV MEMORIÁL 11. ročník
2. – 4. september 2021
Chata Trubárka, Trenčín - Kubrica

ISBN 978-80-972752-8-0

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

© Vydal: Centrum biovied - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied,
Bratislava 2021