

HPLC/MS ANALYSIS OF SULPHONATED AZODYES AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS IN AQUEOUS SOLUTIONS TREATED WITH A NOVEL ELECTROCHEMICAL METHOD

**DANA ANSORGOVÁ^a, MICHAL HOLČAPEK^a,
PAVEL JANDERA^a, ANASTASIOS SAKALIS^b,
and ANASTASIOS VOULGARPOULOS^b**

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, n. Čs. legii 565, 532 10 Pardubice, ^bLaboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, University Campus, 54124 Thessaloniki, Greece

Azodyes are used as the main category of dyestuffs in textile industry¹. These compounds are extremely difficult to be decomposed in the wastewater, since they are very resistant to biodegradation, mainly due to stereo-chemical interferences. Regardless of the incomplete biodegradation, the biological treatment is still the most widely applied method²⁻⁴. The electrochemical treatment is a relatively new trend in the azodyes wastewater management giving very promising results⁵⁻⁷. Concerning the quality of the treated wastewater, only indirect parameters are usually checked, which provide only general characterization of the treated wastewater and give no information about composition and concentration of final degradation products, even though many of them exhibit high toxic and carcinogenic potential.

The general description of a novel electrochemical method for textile wastewater and results of the separation and identification of the final degradation products are presented. Ion-pairing liquid chromatography coupled with PDA and mass spectrometric detector was used for the evaluation of the aromaticity of the final wastewater as well as for the identification of some degradation products.

Aqueous solutions of sulphonated azodyes containing a suitable concentration of electrolyte were treated in a laboratory scale electrolytic cell with a novel electrochemical method for textile wastewater treatment. Carbon fleece was used as a cathode and platinated titanium (Pt/Ti) was used as an anode. Ion-pairing reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC)⁸⁻¹⁰ coupled with ultraviolet (UV), photodiode array (PDA) and mass spectrometric (MS) detectors was applied for the analysis of studied dyes, their impurities and degradation products. The interpretation of electrospray ionization (ESI) mass spectra^{11,12} enabled the confirmation of the structures of initial dyes and their impurities. The coupling of ion pairing HPLC with electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was applied for the identification of degradation products after electrochemical treatment of sulphonated azodyes. The suggested structures of degradation products could drive to the development of general mechanisms for degradation pathways of polysulfonated azodyes.

The authors thank to the Grant Agency of Czech Republic for the support of this work under project No. 203/01/0238, to the Ministry of Education of Czech Republic for research project No. 253100002 and to the University of Pardubice for internal grant No. 320030.

REFERENCES

1. Venkataraman K.: *The Analytical Chemistry of Synthetic Dyes*. Wiley, New York 1997.
2. Mohan S. V., Rao N. C., Prasad K. K., Karthikeyan J.: *Waste Manage.* 22, 575 (2002).
3. Young L., Jian Y.: *Water Res.* 31, 1187 (1997).
4. Razo-Flores E., Luijten M., Donlon B., Lettinga G. Field J.: *Water Sci. Technol.* 36, 65 (1997).
5. Ogutveren U. B., Koparal S.: *J. Environ. Sci. Health, Part A* 29, 1 (1994).
6. Lorimer J. P., Manson T. J., Plates M., Phull S. S.: *Ultrason. Sonochem.* 7, 237 (2000).
7. Vlyssides A. G., Loizidou M., Karlis P. K., Zorbas A. A., Pappaioannou D.: *J. Hazard. Mater., B* 70, 41 (1999).
8. Perez-Urquiza M., Prat M. D., Beltran J. L.: *J. Chromatogr., A* 871, 227 (2000).
9. Alonso M. C., Castillo M., Barceló D.: *Anal. Chem.* 71, 2586 (1999).
10. Storm T., Reemtsma T., Jekel M.: *J. Chromatogr., A* 854, 175 (1999).
11. Holčapek M., Jandera P., Přikryl J.: *Dyes Pigm.* 43, 127 (1999).
12. Holčapek M., Jandera P., Zderadička P.: *J. Chromatogr., A* 926, 175 (2001).

MODULACE AKTIVIT CYTOCHROMŮ P450 BENZIMIDAZOLOVÝMI ANTIHELMINTIKY

**VENDULA BALIHAROVÁ, JAKUB VELÍK,
JÍŘÍ LAMKA, RADKA BALARINOVÁ,
LUDMILA TAHOTNÁ a LENKA SKÁLOVÁ**

Farmaceutická fakulta, Karlova univerzita, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Benzimidazolová antihelmintika jsou celosvětově používána ve veterinární a humání medicíně. Řada z nich byla popsána jako induktory aktivit cytochromů P450 u potkana a člověka. S ohledem na velmi dobře známé mezidruhové rozdíly v zastoupení a aktivitách P450 isoforem by měly být indukční účinky těchto léčiv otestovány přímo na cílových *species*. Proto jsme izolovali hepatocyty z jater těchto zvířat a primární kultury hepatocytů byly použity jako modelový systém pro testování modulační aktivit P450. Po 48h inkubace hepatocytů s testovanými léčivy byly měřeny aktivity P4501A a 3A (EROD a BROD) a byl zjištěn obsah proteinu pomocí imunoblotingu.

Významným představitelem benzimidazolových antihelmintik je albendazol. Dominantní skupinou uživatelů tohoto léčiva jsou přežvýkavci. V prezentované studii jsme proto použili muflony a výsledky porovnali s potkanem, který představuje běžně používané modelové zvíře pro testování veterinárních léčiv. Albendazol vyvolal statisticky významnou indukci aktivit cytochromů P4501A i 3A u potkana. Na druhé straně, pouze slabé, farmakoterapeuticky nevýznamné zvýšení aktivit P4501A i 3A bylo zjištěno u muflona. Dalšími ze skupiny benzimidazolových antihelmintik jsou fenbendazol, flubendazol a mebendazol. Vzhledem k jejich častému využití k terapii helmintóz u prasat jsme vybrali toto *species* i pro naše

experimenty. Zatímco fenbendazol vyvolal statisticky významnou indukci P4501A aktivit, žádné ovlivnění těchto aktivit nebylo pozorováno po inkubaci s flubendazolem a mebendazolem.

S ohledem na naše výsledky lze předpokládat, že albendazol, flubendazol a mebendazol představují bezpečnou terapii helmintóz u muflona, resp. prasete. V případě použití fenbendazolu pro terapii helmintóz u prasete by měly být vzaty v úvahu farmakologické a toxikologické následky indukce P4501A (riziko farmakoterapeutických interakcí a zdravotní závadnosti masa).

Tento projekt byl realizován za podpory Grantové agentury České republiky, grant č. 524/03/1361 a Fondu rozvoje vysokých škol, grant č. 2992/2003.

BEHAVIOR OF 1,2,3-TRICHLOROPROPANE IN THE ACTIVE SITE OF WILD TYPE AND MUTANT HALOALKANE DEHALOGENASE DhaA, A MOLECULAR DYNAMICS STUDY

PAVEL BANÁŠ^a, MICHAL OTYEPKA^a,
and JIŘÍ DAMBORSKÝ^b

^aDepartment of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, ^bNational Center for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno

1,2,3-Trichloropropane (TCP) is a toxic synthetic chlorinated hydrocarbon known to occur naturally. TCP is resistant to biological and chemical degradation and is often found as a water pollutant. Thermodynamics calculation shows that aerobic mineralization of TCP could provide sufficient energy to sustain microbial growth. The haloalkane dehalogenase (DhaA) from *Rhodococcus* sp. m15-3 hydrolyzes carbon-halogen bonds in a wide range of haloalkanes, including TCP, to the corresponding (halo)alcohol, releasing halide ions. Recently a way how to improve DhaA enzyme to utilize TCP as substrate has been proposed by Bosma et al.¹

The goal of the work was to explain why is the mutated enzyme more effective than wild type DhaA by means of molecular modeling. The molecular dynamics method was used as a powerful tool of molecular modeling. Six 1 ns-long simulations were produced; three of them with the DhaA wild-type in complex with 1,2,3-trichloropropane (TCP) in three different binding modes TCP(bm1), TCP(bm2), and TCP(bm3) and three of them with C176Y+Y273F double mutant of DhaA (M2-DhaA according to Bosma T. et al.¹). The product stereospecificity of dehalogenation by wild-type DhaA is 70–80 % of (*R*)-enantiomer (e.g. dehalogenation from bm2 mode) and 20–30 % of (*S*)-enantiomer (e.g. dehalogenation from bm3 mode).

Both simulations of wt-DhaA/TCP(bm1) and M2-DhaA/TCP(bm1) show that the dehalogenation from Cb is not possible, due to a sterical hindrance of TCP in the active site. Moreover, TCP changes its binding mode in both simulations from TCP(bm1) to TCP(bm2) mode. The other simulations (wt-DhaA/TCP(bm2), wt-DhaA/TCP(bm3), M2-DhaA/TCP(bm2), M2-DhaA/TCP(bm3)) show the TCP adopts a near

attack conformation (NAC, conformation appropriate for SN2 attack) more frequently during the whole simulation. The near attack conformation is more populated in simulation of M2-DhaA (see Table I).

Table I
Population of NAC for studied systems

System	TCP(bm2) [%]	TCP(bm3) [%]
wt-DhaA	20.7	6.5
M2-DhaA	28.9	11.7

The population of NAC in wt-DhaA is in agreement with experimental data about stereospecificity of product.

REFERENCES

1. Bosma T., Damborsky J., Stucki G., Janssen D. B.: Appl. Environ. Microbiol. 68, 3582 (2002).

OVLIVNĚNÍ GLYKACE BÍLKOVIN ANTIOXIDANTY IN VITRO. VLIV KYSELINY MOČOVÉ NA GLYKOXIDACI AMINOTRANSFERAS

I. BOUŠOVÁ^a, J. DRŠATA^a, J. SOBOTKOVÁ^a,
M. BERÁNEK^b a V. PALÍČKA^b

^aFarmaceutická fakulta, Karlova univerzita a Výzkumné centrum LN00B12.5, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^bÚstav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Glykace je významným faktorem podléjícím se na procesu stárnutí a rozvoji chronických onemocnění, jako je diabetes, aterosklerosa a Alzheimerova choroba. Je to sled neenzymových reakcí probíhajících mezi redukcujícími monosacharidy (v organismu nejčastěji glukózou) a volnými aminoskupinami bílkovinného řetězce (nejčastěji lysinu). Během tohoto procesu vznikají volné radikály, intermediární a koncové produkty glykace (AGEs) a produkty autooxidace glykujícího cukru (= proces glykoxidace). K perspektivním terapeutickým zásahům patří omezení účinku volných radikálů působením antioxidantů přírodního (převážně rostlinné antioxidanty) nebo endogenního původu. Endogenním antioxidantem je i kyselina močová, která se v organismu vyskytuje v poměrně vysoké koncentraci a podílí se na zhašení volných radikálů v plazmě. Jako model glykoxidace byly v této práci použity systémy „AST + D-fruktosa“ a „ALT + D-fruktosa“, jejichž vlastnosti byly popsány v dříve publikovaných pracích^{1,2}. Aminotransferasy jsou vhodnými modelovými bílkoviny, protože ve své molekule obsahují několik lysinových zbytků, z nichž jeden je součástí aktivního místa enzymu. Sledovali jsme vliv 1,2 mM kyseliny močové na aktivitu obou enzymů a vznik fluorescenčních pozdních produktů glykoxidace během inkubace při 37 °C v kontrolních pokusech a v přítomnosti 50 mM a 500 mM D-fruktosy. Kyselina močová vykazoval

vala negativní přímý vliv na aktivitu ALT (snížení aktivity o 20 % po 6 dnech inkubace), přímý vliv na AST jsme nezaznamenali. U obou enzymů se uplatnil pozitivní nepřímý vliv kyseliny močové jako omezení glykoxydačního účinku cukru (při 50 mM fruktose byla aktivita AST v přítomnosti kyseliny močové po 10 dnech inkubace o 26 % vyšší a aktivita ALT po 6 dnech inkubace o 22 % vyšší). Tento pozitivní efekt převážil i u ALT nad negativními přímými účinky kyseliny močové. Nepřímý vliv kyseliny močové byl závislý na koncentraci cukru v inkubační směsi a výrazněji se projevil v přítomnosti 50 mM fruktosy. U obou enzymů jsme prokázali vznik fluoroskujících koncových produktů (AGEs). V přítomnosti kyseliny močové byla tvorba AGEs nižší.

Práce byla podpořena grantem GA UK 95/2002 a Výzkumným záměrem MSM 111600002.

LITERATURA

1. Beránek M. et al.: Mol. Cell. Biochem. 218, 35 (2001).
2. Dršata J. et al.: Enzyme Inhib. Med. Chem. 17, 31 (2002).

PEA SEEDLING AMINOALDEHYDE DEHYDROGENASE: PRIMARY STRUCTURE AND ACTIVE SITE RESIDUES

FRANTIŠEK BRAUNER^a, MAREK ŠEBELA^{a,*}, JACQUES SNÉGAROFF^b, PAVEL PEČ^a, and JEAN-CLAUDE MEUNIER^b

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^bJoint research unit of Chimie Biologique, Institut National de la Recherche Agronomique-Institut National Agronomique Paris-Grignon, F-78850 Thiverval-Grignon, France

The first primary structure of a plant aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH, EC 1.2.1.19) is reported. The enzyme of pea (*Pisum sativum*) seedlings subjected to our study oxidises ω-aminoaldehydes to the corresponding ω-amino acids. Although pea does not accumulate betaine aldehyde as a compatible osmolyte, the N-terminal sequence of a purified pea AMADH resembles those of plant betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs). On the basis of an anticipated pea AMADH homology to these enzymes, degenerated oligonucleotide primers were designed and used for PCR amplification. Two cDNA fragments were obtained in initial 5' RACE experiments. Subsequent 5' and 3' RACE performed with specific non-degenerated primers provided two putative cDNAs of the plant BADH family. Both encoded protein sequences (AMADH1 and AMADH2) are highly homologous to those of plant BADHs. They show 81 % identity and 92 % in mutual alignment. As a deduced product of the first cDNA, AMADH1 matches completely the N-terminal sequence of pea AMADH analysed previously by Edman degradation. AMADH 2 represents a putative AMADH or BADH that has not yet been isolated and characterised. We also tried to identify essential amino acid residues of a purified pea AMADH by both determination of its dissociation constants and evaluation of inhibition effects of specific modification reagents. From our

results is clear that there are Cys (pK = 8.0) and Glu/Asp residues at the active site participating in the catalysis. This is in accordance with the presence of the conserved Glu and Cys active site regions of plant BADHs in both AMADH1 and AMADH2.

ANALÝZA KOMPLEXU PROTEINU p53 S DNA POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

VÁCLAV BRÁZDA

*Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno
e-mail: vaclav@sci.muni.cz*

Vazbou nádorového supresoru proteinu p53 na DNA jsou zprostředkovány zásadní funkce tohoto proteinu, který se podílí na ochraně buňky před vznikem nádorového bujení. Významná je zejména vazba proteinu p53 na responzibilní sekvence v promotorech některých genů důležitých pro apoptózu a regulaci buněčného cyklu. Responzibilní sekvence je tvořena obvykle dvaceti páry bází se sekvencí (PuPuPuC(A/T)(T/A)PyPyPy)₂x. Pro analýzu komplexů proteinu p53 s DNA jsme použili purifikovaný protein p53 a deleční mutanty proteinu p53. Oligonukleotidy obsahující responzibilní sekvence pro protein p53 byly naznačeny fluoresceinem. Po navázání proteinu p53 na DNA byly komplexy separovány pomocí kapilární elektroforézy. Detekce založená na fluorescenci excitované argonovým laserem nám umožnila analýzu nanogramových množství komplexů. Naše měření ukázala, že mezi afinitou proteinu p53 k jednotlivým responzibilním sekvencím jsou značné rozdíly a nejlépe se protein p53 váže k promotorové sekvenci z genu proteinu p21. Jak jsme ukázali, tato gelová kapilární elektroforéza (CGE) umožňuje analýzu komplexů p53 s oligonukleotidy, ale také s dlouhými molekulami DNA. Použití kapilární elektroforézy pro studium vazby p53 s DNA značně snižuje nároky na množství vzorku oproti klasické deskové elektroforéze a umožňuje velmi rychlou kvantitativní analýzu vhodnou pro rutinní analýzy a automatizaci.

GA ČR 301/00/D001 GA AV B5004203.

VLIV SUBSTITUENTU CHINOXALINU NA ROZPOZNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH KATIONTŮ

HANA BŘEZNOVÁ^a, R. VOLFA^a, VLADIMÍR KRÁL^a, J. L. SESSLER^b, A. C. TRY^b a T. V. ŠÍŠKANOVÁ^a

^aKatedra analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bUniversity of Texas, Department of Organic Chemistry and Biochemistry, Austin, TX 78712 USA

Schopnost derivátů 5-nitrochinoxalinu vázat různé anionty (F⁻, Cl⁻ and H₂PO₄⁻ jako tetrabutylamoniové soli) byla již popsána a diskutována¹. Dále v předchozí práci bylo zjištěno, že deriváty 5-nitrochinoxalinu 2,3-disubstituované

2-pyrrolem a 2-thiofenem interagují s kationty². Vliv jednotlivých substituentů na tuto interakci je studován v této práci. Jednotlivé deriváty chinoxalinu byly proměřovány v monomerní formě v PVC membránových elektrodách s různými plastifikátory a porovnávány s polymerní formou receptorů v „coated-wire“ elektrodách. Polymerace probíhala podle již známého postupu³.

Pro momomerní formu receptoru v PVC membránových elektrodách bylo pozorováno, že:

- 1) elektroda s nesubstituovaným chinoxalínom a s nitrofenyloktyléterovým plastifikátorm vykazovala selektivitu pro kationt Ag^+ a Cs^+ na rozdiel od elektrody s dioktylfthalátovým plastifikátorm,
- 2) selektivita pro kationty Ag^+ a Cs^+ byla po navázání nitroskupiny na chinoxalín ztracena. Odezva membránových elektrod s nitrochinoxalínom na jednomocné kationty se zlepšovala s lipofilitou kationtu pro oba plastifikátory,
- 3) navázání dalších substituentů (2-pyrolýl A a 2-thienýl B) na 5-nitrochinoxalín vedlo ke zvýšení selektivity v případě A vůči Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} a v případě B vůči Pb^{2+} a Ag^+ kationtům, přičemž selektivita byla ovlivněna polaritou plastifikátorm.

Pro polymerní formu v „coated-wire“ elektrodách bylo zjištěno, že:

- 1) nitroskupina 5-nitrochinaxalinu byla redukována na aminoskupinu z důvodu polymerizace. U elektrody polymerizované s 5-aminochinoxalinu nebyla pozorována žádná odezva,
- 2) elektrody s poly(2,3 deriváty 5-aminochinoxalinu) ukázaly selektivitu podobnou membránovým elektrodám.

Závěrem lze říci, že samotný chinoxalin má afinitu k jednomocným kationtům. Navázáním elektrofilní nitroskupiny se tato afinita ztrácí. 2,3-Deriváty 5-nitrochinoxalinu jsou citlivé na kationty, což je dáno právě substituenty. K tomuto závěru přispívá i podobné chování polymerních elektrod.

Práce byla podporována MŠMT ČR (MSM 223400008).

LITERATURA

1. Black C. B., Andrioletti B., Try A. C., Ruiperez C., Sessler J. L.: J. Am. Chem. Soc. *121*, 10438 (1999).
2. Březnová H., Volf R., Král V., Sessler J. L., Try A. C., Shishkanova T. V.: Anal. Bioanal. Chem., v tisku.
3. Hrdlicka J., Volf R., Plačák L., Shishkanova T. V., Král V., Try A. C., Sessler J. L.: *Electroanalysis 8th International Conference, Bonn, 11–15 June 2000*.

NOVÁ TECHNOLOGIE VÝROBY IONTOVĚ SELEKTIVNÍCH ELEKTROD – TŘÍVRSTEVNÉ ELEKTRODY

**GABRIELA BRONCOVÁ, HANA BŘEZNOVÁ,
PAVEL MATĚJKA, RADKO VOLF
a VLADIMÍR KRÁL**

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-techno-
logická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6

Iontové selektivní elektrody (ISE) v dnešní době představují jednoduchý analytický nástroj používaný v celé řadě oborů zejména v klinické medicíně, v procesní kontrole a v analýzách životního prostředí. ISE jsou používány především pro svou jednoduchost a zpravidla nepříliš velkou cenu. Praktické využití nacházejí ISE zejména při potenciometrických měřeních pH a při stanoveních koncentrace iontů v nejružnějších matricích. Jeden z nových typů ISE jsou „coated-wire“ elektrody, jež jsou určeny pro zjišťování iontů organických kyselin. Výběrem vhodného polymeru deponovaného na podkladovém materiálu elektrody lze měnit vlastnosti elektrod, především jejich selektivitu. U těchto elektrod je kladen důraz právě na selektivitu a citlivost, která je bohužel ovlivněna podkladovým materiálem. Podkladové materiály jsou kovy, které mají funkci nejen nosiče, ale především také katalyzátoru při vlastní tvorbě filmu. Jako nejlepší nosný materiál se jeví Pt a Au. Tyto kovy však mají podstatný vliv při potenciometrických měřeních, což je známo z literatury¹ a také naše dosavadní výsledky tomu nasvědčují.

Cílem našeho výzkumu bylo navrhnout a vyzkoušet nové technologie výroby elektrod a to vícevrstevných elektrod na bázi elektricky vodivých polymerů. K návrhu této technologie nás vedla myšlenka odstínění vlivu podkladového materiálu, v našem případě především platiny, z důvodů rušení tohoto podkladového materiálu při testování polymerních filmů metodou potenciometrickou. Nejprve bylo třeba najít vhodné podmínky pro přípravu vícevrstevných elektrod, které byly odlišné od přípravy jednovrstevných elektrod. Výhodou vícevrstevných elektrod by měla být jejich vyšší citlivost a selektivita.

V experimentech byla odzkoušena jako první vrstva polythiofen, který měl odstínit vliv podkladové platiny a také přispět svými katalytickými účinky při polymeraci další vrstvy. Druhá a třetí vrstva byly tvořeny nespecificky interagujícími polymery polyanilinem a polypyrrolem či selektivním polymerem neutrální červeně. Jejich pořadí bylo měněno. Polymer neutrální červeně specificky interaguje s citrátovými ionty². Přítomnost jednotlivých vrstev byla ověřena Ramanovou spektroskopií a elektronovým mikroskopem.

Nově vytvořená technologie přípravy elektrod by měla být dále použita pro nové citlivé polymerní vrstvy s využitím samostatně jako ISE či v senzorových polích elektronických jazyků a nosů.

LITERATURA

1. Lucas C. A., Markovič N. M., Ross P. N.: J. Am. Phys. Soc. 55, 7964 (1997).
2. Broncová G., Volf R., Shishkanova T. V., Matějka P., Král V.: *Euroanalysis-12, Dortmund, 8–13 September 2002*, Book of Abstracts P2-016, str. 446.

IN VITRO CLONING AND EXPRESSION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* GENE FOR APX II PROTEIN

**R. BURDYCHOVÁ^a, M. RYCHTERA^a,
L. BABÁK^a, and M. BARTOŠ^b**

^aFaculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ^bGenex CZ, s.r.o., Podstránská 74, 627 00 Brno

Actinobacillus pleuropneumoniae is a Gram-negative bacterium which is the etiological agent of porcine pleuropneumonia, an acute or chronic respiratory infection affecting pigs of all ages. Epidemiological data suggest, however, that virulence of this bacterium is strongly correlated with the presence of Apx toxins. Discoveries on the immunogenicity of *A. pleuropneumoniae* Apx toxins in infected pigs have stimulated studies trying to achieve protection from *A. pleuropneumoniae* by use of these toxins. Results of the studies using various combinations of exotoxins and membrane proteins have shown the vaccine containing Apx I, Apx II, and Apx III toxins to provide most efficient protection from infection with all *A. pleuropneumoniae* serotypes.

In this study, the recombinant *A. pleuropneumoniae* Apx II protein was produced for this purpose. The gene coding Apx II toxin was amplified from the *A. pleuropneumoniae* serotype 4 DNA using polymerase chain reaction (PCR).

The resulting fragment (2871 bp) was cloned in the pCRT7/NT TOPO cloning vector (Invitrogen, The Netherlands) under the control of strong, inducible T7 promoter and introduced into chemically competent *E. coli* cells. The presence of insert was confirmed by PCR screening and sequencing after the propagation of recombinant DNA in *E. coli* cells.

The pCRT7/NT TOPO cloning vector (Invitrogen, The Netherlands) was constructed to allow foreign peptides be expressed in *E. coli* as fusion proteins. The gene coding *A. pleuropneumoniae* Apx II toxin was extended with a segment to encode a polyhistidine tag linked to its C-terminal sequence allowing a one-step affinity purification of the complex.

Small-scale expression studies of 10 of the clones were used to select the best Apx II producing culture. The largest amount producing clone was used for large-scale production in bioreaktor. Expression of Apx II coding sequence in *E. coli* resulted in the formation of insoluble inclusion bodies. The Apx II production reached a level of 4,5 mg.l⁻¹ over an expression period of 3 h.

The inclusion bodies were solubilized and mixed with Ni-NTA resin (QIAGEN, USA). Purification passed according to a standard purification protocol and imidazole elution was successfully used.

The ease of this expression system, the powerful single step purification and low costs makes it possible to produce Apx II in large amounts to further study the role of Apx II in physiological processes.

NUCLEAR MYOSIN I AND ACTIN ARE REQUIRED FOR TRANSCRIPTION OF RIBOSOMAL GENES

**HANA DINGOVÁ, VLADA V. PHILIMONENKO,
and PAVEL HOZÁK**

Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4

We investigated the role of recently described nuclear myosin I (NMI) and actin in transcription. Transcription of rDNA is carried out by RNA polymerase I (Pol I) and takes place in a special nuclear structure – the nucleolus. Ultrastructurally, actin and NMI distribution in nucleolar components is dependent on Pol I transcription, and NMI co-localizes with nascent rRNA in the dense fibrillar component. Pol I purification and immunoprecipitation experiments demonstrate that actin is a part of Pol I holoenzyme. Rate of Pol I transcription *in vitro* is dramatically reduced by antibodies directed against NMI or actin. On the contrary, addition of purified NMI stimulates transcription. The involvement of actin and NMI in the Pol I transcription was confirmed *in vivo* using intranuclear microinjection. Nascent transcripts were identified after BrUTP incorporation in permeabilized cells, or by a “hypotonic shift” that allows entry of small hydrophilic molecules into living cells. Intranuclear microinjections of anti-actin and anti-NMI antibodies inhibit nucleolar transcription: the reduction of the signal was about 35 % upon microinjection of anti-actin antibodies, and about 20 % following microinjection of anti-NMI antibodies (compared to control cells microinjected with fluorescent dextran or unrelated antibodies). Our results clearly demonstrate that nuclear myosin I and actin are involved in transcription by RNA polymerase I.

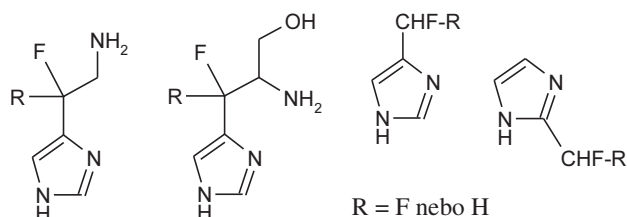
PŘÍPRAVA FLUOROVANÝCH DERIVÁTŮ BIOLOGICKY VÝZNAMNÝCH IMIDAZOLŮ

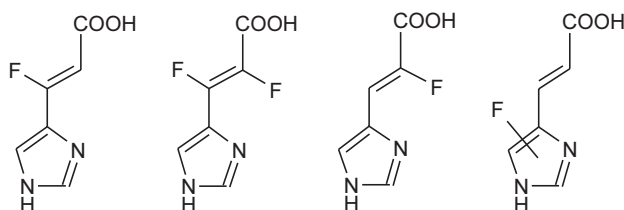
BOHUMIL DOLENSKÝ^a a KENNETH L. KIRK^b

^aÚstav analytické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bNational Institutes of Health, NIDDK, LBC, Bethesda, MD 20892, USA

e-mail: blbek@seznam.cz

Přírodní látky, v jejichž struktuře je atom vodíku nahrazen atomem fluoru, nacházejí použití v nejrůznějších oblastech výzkumu procesů probíhajících v živých organismech. Využívá se především skutečnosti, že záměnou vodíku za fluor nevzniká velká změna velikosti molekuly, ale dramaticky je však změněna polarita, hydrofilita a stabilita látky. Skutečnost, že fluo-





rované organické látky nejsou v živých organismech obsaženy, je rovněž využitelná pro sledování různých dějů. Problémem však zůstává příprava těchto fluorovaných látek. Téměř vždy jsou fluorované deriváty přírodních látek připravovány více-
stupňovou syntézou.

Úspěšné i neúspěšné přístupy k přípravě fluorovaných derivátů histaminu, histidinolu, histidinu, methylimidazolů a urokanové kyseliny budou prezentovány.

LITERATURA

1. Fan J., Dolensky B., Kim I. H., Kirk K. L.: J. Fluorine Chem. 115, 137 (2002).
2. Dolensky B., Takeuchi Y., Cohen L. A., Kirk K. L.: J. Fluorine Chem. 107, 147 (2001).
3. Dolensky B., Kirk K. L.: J. Org. Chem. 66, 4687 (2001).
4. Dolensky B., Kirk K. L.: J. Org. Chem. 67, 3468 (2002).
5. Dolensky B., Kirk K. L.: Collect. Czech. Chem. Commun. 67, 1335 (2002).

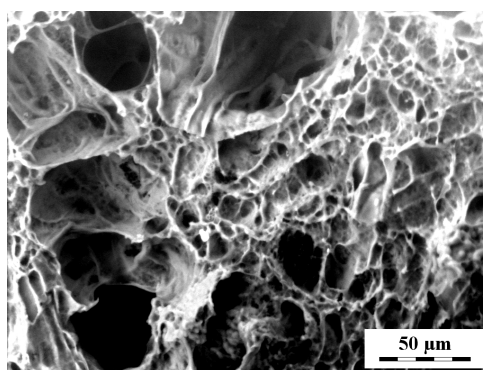
MAKROPORÉZNÍ GELY S ŘÍZENOU POROZITOU PRO REGENERACI NERVOVÉ TKÁŇE

HANA DRNOVSKÁ^{a,b} a FRANTIŠEK RYPÁČEK^a

^aÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky a ^bCentrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6

Současné pokroky v buněčné a molekulární biologii otevírají nové možnosti terapeutického využití kmenových buněk při náhradách a regeneraci tkání. Důležitou roli v těchto nových postupech plní polymerní biomateriály sloužící jako podpůrná struktura implantovaných buněk a plnící funkci mezibuněčné hmoty vyvíjející se tkáně. Zaměřili jsme se na vývoj biomateriálu pro regeneraci nervové tkáně, potenciálně využitelného např. při reparaci míšních lézí. Cílem je vyvinout velmi měkký polymerní gel s velkým vnitřním objemem vzájemně propojených pórů, které by svými rozměry, tvarem i prostorovou orientací umožňovaly osídlení biomateriálu kmenovými buňkami. Zároveň by měl být zaručen přívod živin a růstových faktorů za současné podpory komunikace a kooperace neuronů a gliových buněk.

Síťované hydrogely byly připraveny radikálovou polymerací (2-hydroxyethyl)-methakrylátu (HEMA) a ethylen-dime-thakrylátu (EDMA). Makroporézní struktura gelu byla vytvořena (a) metodou vymývání tuhého organického porogenu, (b) fázovou separací polymeru v přítomnosti systému rozpouštědlo–srážedlo a (c) kombinací vymývání tuhého porogenu



Obr. 1. Hydrogel na bázi polyHEMA s přidavkem 80 % srážedla (obsah porogenu 0,287 g.cm⁻³)

a systému rozpouštědlo–srážedlo. Obsah vody v gelech byl stanoven měřením rovnovážného stupně botnění. Porozita a morfologie vodou nabitých gelů byla studována nízkovakuumovou rastrovací elektronovou mikroskopií (Aquasem, Tescan, ČR). Na příkladu hydrogelů na bázi polyHEMA jsou demonstrovány strategie přípravy gelů s řízenou velikostí (10–70 μm) i architekturou pórů. Jsou diskutovány možnosti a syntetické postupy pro modifikaci povrchových vlastností biomateriálu a zavedení specifických peptidových struktur podporujících adhezi a proliferaci buněk.

Výzkum je prováděn s finanční podporou programu výzkumných center MŠMT LN00A065.

REGULACE BIOSYNTÉZY VALINU U *Corynebacterium glutamicum*

VERONIKA ELIŠÁKOVÁ, JIŘÍ HOLÁTKO a MIROSLAV PÁTEK

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Bakterie *Corynebacterium glutamicum* je významným průmyslovým producentem aminokyselin. S využitím metod genového inženýrství jsou konstruovány nové produkční kmeny s vyšší hladinou požadovaného produktu. Jedním z těchto produktů je aminokyselina valin, která je pro člověka i zvířata esenciální.

V buňkách *C. glutamicum* je valin syntetizován spolu s isoleucinem paralelní biosyntetickou drahou, která se dále větví na dráhy syntézy leucinu a pantotenátu. Enzymy katalyzující tvorbu valinu a isoleucinu jsou kódovány geny *ilvBN* (synthasa aceto-hydroxykyselin), *ilvC* (reduktoisomerasa aceto-hydroxykyselin), *ilvD* (dehydratasa dihydroxykyselin) a *ilvE* (transaminasa). Regulace této biosyntetické dráhy byla studována jak na úrovni transkripce, tak na úrovni enzymové aktivity.

Klíčovým enzymem biosyntetické dráhy valinu a isoleucinu je synthasa aceto-hydroxykyselin (AHAS). Regulační

podjednotka tohoto enzymu váže konečné produkty dané dráhy (valin, leucin, isoleucin) a řídí tak regulaci aktivity enzymu zpětnou vazbou. S využitím metody místně specifické mutagenese byly do potenciálního vazebného místa pro valin (resp. leucin a isoleucin) zavedeny záměny jedné až tří aminokyselin. Pro měření aktivity mutantních enzymů byl zkonstruován kmen *C. glutamicum* Δ ilvN, který byl transformován plazmidem nesoucím mutované geny. Získáni byli dva mutanti (M8 a M13), kteří vykazují úplnou rezistenci k inhibici 10 mM valinem, leucinem i isoleucinem. Tyto výsledky naznačují, že vazebné místo pro všechny tři aminokyseliny je totožné.

Pro cílenou konstrukci nového produkčního kmene je nezbytná znalost transkripčních signálů genů dané dráhy. Z tohoto důvodu byly s využitím promoter-probe vektoru pET2 a reportérového genu cat analyzovány promotory P-ilvB, P-ilvN, P-ilvD a P-ilvE. Metodou primer-extension byly přesně stanoveny příslušné transkripční počátky u P-ilvN, P-ilvD a P-ilvE. Znalost transkripčního profilu genů účastnících se biosyntézy valinu je tak kompletní. Při použití různých dlouhých fragmentů DNA nesoucích tyto promotory a různých kultivačních podmínek (nadbytek valinu nebo naopak hladovění na valin) byla studována regulace jejich exprese valinem. V případě P-ilvB, který je řízen transkripční atenuací, bylo zjištěno, že oblast nedokonalé přímé repetice, lokalizované před vlastním promotorem, výrazně zvyšuje jeho aktivitu. Při hladovění na valin docházelo k derepresi promotoru a jeho aktivita měřená prostřednictvím aktivity reportérového enzymu (chloramfenikolacetyltransferasy) se zvýšila oproti buňkám rostoucím s přebytkem valinu až 50x. V souladu s tímto zjištěním způsobila delece atenuátoru 40-ti násobné zvýšení promotorové aktivity. P-ilvN byl lokalizován 340 bp před iniciačním kodonem, uvnitř genu ilvB. Analýza tohoto promotoru prokázala, že oblast lokalizovaná mezi vlastním promotorem a translačním startem genu ilvN způsobuje výrazné snížení aktivity tohoto promotoru. Měření aktivit P-ilvD a P-ilvE bylo zjištěno, že P-ilvD je slabý, zatímco naopak P-ilvE poměrně silný promotor.

Na základě výsledků analýzy regulace dráhy biosyntézy valinu byla zahájena konstrukce produkčního kmene *C. glutamicum*, jejíž podstatou jsou přímé zásahy (delece, inserce a výměny) do chromozomu této bakterie. Cílem těchto modifikací je posílit tok intermediátů směrem k syntéze valinu (delece atenuátoru P-ilvB, zavedení mutace M13 způsobující rezistenci AHAS ke zpětnovazební inhibici) a zároveň zablokovat nebo oslabit kompetující dráhy vedoucí k tvorbě isoleucinu a pantotenátu (delece v genech ilvA a panB). Modifikované úseky DNA byly integrovány do chromozomu pomocí plazmidu pK18mobsacB. Letální gen sacB byl využit pro selekci žádaných konstruktů po druhé rekombinaci, jejíž důsledkem bylo vyštěpení veškerých vektorových sekvencí. Výsledkem modifikací je kmen *C. glutamicum* Δ ilvA Δ panB ilvNM13 Δ AttP-ilvB, který je testován na produkci valinu. Dalšími kroky jsou inserce silných promotorů před geny ilvD a ilvE. Hlavní výhodou takto zkonstruovaného kmene je absence plazmidu a tedy i genu pro rezistenci k antibiotiku, používaného jako marker.

VLIV HUMINOVÝCH KYSELIN NA BIODEGRADAČNÍ A ENZYMOVOU AKTIVITU MIKROBNÍCH POPULACÍ VŮČI FENOLICKÝM AROMÁTŮM

**ARIANA FIALOVÁ, MARTINA SIGLOVÁ,
ALENA ČEJKOVÁ, JAN MASÁK
a VLADIMÍR JIRKŮ**

ÚKCHB, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: Ariana.Fialova@vscht.cz

Odstraňování aromatických polutantů biologickou, šetrnou a efektivní cestou, je podmíněno konkrétními podmínkami v kontaminované lokalitě a biodegradačním potenciálem použité mikrobní populace. Ve snaze zvýšit toleranci mikroorganismů vůči fenolátům a biodegradační rychlost, je testován vliv přídavku huminových kyselin (HAs), komplexních polyhydroxyfenolových výluhů humusu. Bližší charakterizace s tímto vlivem přímo souvisejících biodegradačních a enzymových mechanismů je proto nezbytným předpokladem úspěšného nasazení HAs a mikroorganismů při bioremediačním procesu.

Nepatogenní půdní kvasinka a bakterie, schopné využít fenol a některé jeho deriváty jako jediný zdroj uhlíku a energie, jsou v této studii použity jako modelové organismy. Kvasinka *Candida maltosa*, izolovaná z půdy dlouhodobě kontaminované ropnými uhlovodíky, prokázala schopnost degradovat resorcinol, katechol, fenol, hydrochinon a dinitrofenol. Sbírková bakterie *Rhodococcus erythropolis* s vysokou adaptační schopností byla schopná využít resorcinol, katechol, fenol, hydrochinon, 4-hydroxybenzoát a *p*-kresol. Pro oba mikroorganismy byly vybrány optimální kultivační podmínky (typ média, pH, teplota), byly stanoveny limitní koncentrace zdrojů uhlíku a energie a některé enzymové aktivity v přítomnosti a nepřítomnosti HAs různého typu. Kvasinka byla více tolerantní vůči vyšším koncentracím daných aromatických látek než bakterie, což potvrdily i hodnoty aktivity prvního enzymu v degrační dráze fenolu, fenol hydroxylasy (E.C. 1.14.13.7), který byl stanovován v průběhu kultivace v hrubém bezbuněčném extraktu po dezintegraci biomasy.

Vliv HAs, majících vysokou afinitu k hydrofobním látkám, spočívá v jejich schopnosti tvořit povrchově aktivní pseudomicely. HAs se v průběhu kultivace kvasinkové i bakteriální populace v přítomnosti fenolu jako jediného zdroje uhlíku a energie naadsorbovaly na povrch buněk, což se nestalo, pokud byla jako zdroj uhlíku a energie použita glukóza. Většina testovaných HAs nebyla kvůli své vysoké molekulové hmotnosti (nemožnost transportu do buněk) mikroorganismy využívána jako zdroj uhlíku a energie, přesto některé z nich byly schopné indukovat intracelulární fenol hydroxylasu i v nepřítomnosti fenolu. Indukce a hodnoty aktivity klíčového enzymu fenol hydroxylasy závisí na použitém substrátu a jeho koncentraci, přičemž oscilace v jeho aktivitě lze zmenšit právě přídavkem HAs do média. Růstové rychlosti a celkový nárůst biomasy na vyšších koncentracích fenolu (0,5 g.l⁻¹) se zvýšil po přídavku HA5, PAB 79, S4 a S5 v koncentracích 0,05 až 0,1 g.l⁻¹ na rozdíl od některých jiných HAs, jejichž přídavek neměl žádný pozitivní vliv na degra-

daci. Vliv HAS na růst a degradaci fenolických látek se liší pro různé typy a koncentrace HAS, ale i pro různé koncentrace a typy zdroje uhlíku a energie.

Dosažené výsledky byly potvrzeny různými uspořádáními měření (batch-kultivace v baňkách, mikrokultivační zařízení BioscreenC a stanovení enzymové aktivity) a ukazují na nutnost provádět obdobné testy vždy pro konkrétní situaci (mikroorganismus, kultivační podmínky, typy huminových kyselin a jejich koncentrace), před použitím v dekontaminačním procesu.

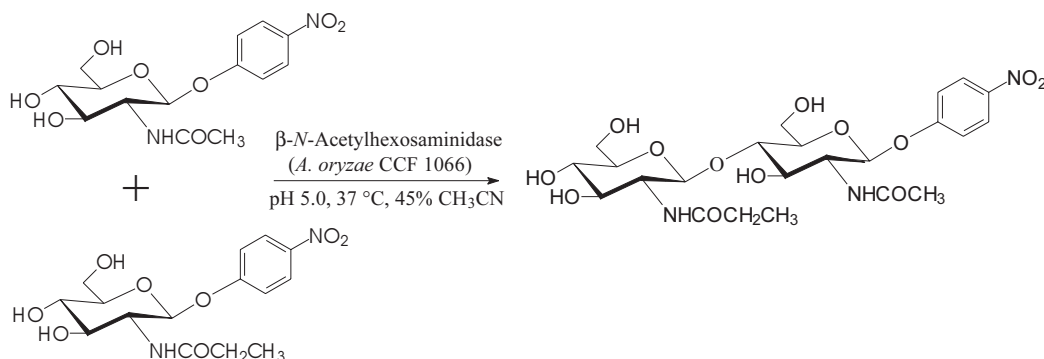
NEW TRANSGLYCOSYLATION REACTIONS CATALYSED BY β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASES

**P. FIALOVÁ, LENKA WEIGNEROVÁ,
A. PIŠVEJCOVÁ, and VLADIMÍR KŘEN**

Laboratory of Biotransformation, Institute of Microbiology,
Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083,
142 20 Prague 4
e-mail: fialovap@biomed.cas.cz

There have been several hints in the literature suggesting that glycosidases exhibit a broad substrate specificity, which enables them to cleave and even to transfer modified glycosidic moieties yielding oligosaccharides¹⁻³. In our project we have investigated the affinity of β -N-acetylhexosaminidases from various sources to substrates bearing different acyls at the 2-C amino group instead of the common acetyl.

Four 4-nitrophenyl 2-acylamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosides (acyl = formyl, glycolyl, propionyl and trifluoroacetyl) and 4-nitrophenyl 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranoside were synthesised from D-glucosamine hydrochloride. They were subjected to a screening comprising 36 β -N-acetylhexosaminidases of mostly fungal origin concerning their hydrolysis rate and transglycosylation potential with the above substrates. As a result, β -N-acetylhexosaminidases from *A. oryzae* CCF 1066, *A. terreus* CCF 2539, *P. oxalicum* CCF 2315 and *P. pitii* CCF 2277 were selected for the catalysis of semi-preparative transglycosylations, which gave yield to several products. It is the first documented case of transglycosylations of modified substrates catalysed by β -N-acetylhexosaminidases. This rather novel concept widely extends the synthetic capability of glycosidases.



Support by the grant 203/01/1018 and 204/02/P096 from the Grant Agency of the Czech Republic and Institutional Research Concept No. AV0Z5020903 is acknowledged.

REFERENCES

1. MacManus D. A. et al: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1999, 295.
2. Mariam G. et al: Carbohydr. Res. 47, 188 (1976).
3. Hušáková L. et al: Carbohydr. Res. 331, 143 (2001).

KVANTITATIVNÍ MOLEKULÁRNÍ MONITOROVÁNÍ NEMOCNÝCH CLL LÉČENÝCH MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKOU ANTI-CD20 A PURINOVÝMI ANALOGY

**K. FORSTEROVÁ, K. PULKRÁBKOVÁ
a A. SLAVÍČKOVÁ**

1. interní klinika VFN, U Nemocnice 2, 120 00 Praha 2
e-mail: maaxa@hotmail.com

Monoklonální protilátka anti-CD20, rituximab (MabThera, Roche), se v poslední době začíná uplatňovat i v léčbě chronických lymfatických leukémií (CLL) nejen jako monoterapie poslední volby, ale i v kombinované léčbě nově diagnostikovaných pacientů. Kombinace chemoterapie s monoklonální protilátkou může zlepšit výsledky léčby a navodit i molekulárně biologickou remisi, tj. vymizení molekulárně biologického markeru maligního onemocnění z orgánu, kde byl předtím detegován – obvykle z periferní krve a kostní dřeně. V současnosti však zůstává otázkou, zda tato dobrá odpověď povede k prodloužení období bez známek onemocnění. Z některých pracovišť vzešel názor, že o lepší prognóze může svědčit rychlost odpovědi na léčbu. Proto lze předpokládat, že kvantifikující molekulární monitorování účinku léčby a reziduálního onemocnění je pro klinická využití přínosnější. Markerem nejčastěji využívaným pro monitorování B-lymfoproliferativních onemocnění pomocí PCR je klonální přestavba oblasti CDR3 genu pro těžký imunoglobulinový řetězec (IgH). Na pracovišti byla již dříve ověřena klinická relevance kvantifikujícího monitorování nemocných NHL s využitím komparativní IgH/ras PCR.

Tato práce ověřuje uplatnitelnost metodiky také při monitorování nemocných CLL. Byl sledován vývoj choroby v kostní dřeni u 14 pacientů, z nichž 13 bylo léčeno kombinací R-FluCy

(rituximab, fludarabin a cyklofosfamid) nebo monoterapií těmito terapeutiky a 1 pacient léčený kombinací R-COP (rituximab, cyklofosfamid, vinkristin, prednison). 7 z těchto 14 sledovaných nemocných navíc kromě léčby podstoupilo autologní transplantaci krvetvorných buněk. Bylo zatím monitorováno 18 období onemocnění a vždy zjištěn souhlas s klinickým stavem pacientů. PCR remise dosáhlo 11 pacientů léčených kombinací R-FluCy, event. R-COP. Nejdelší zatím pozorované období molekulární remise trvalo 21 měsíců. Molekulární regrese, tedy kvantitativní pokles markeru, byla pozorována u 4 pacientů léčených kombinací R-FluCy a molekulární progresi, tj. znovuobjevení nebo kvantitativní nárůst markeru, byla pozorována v 1 případě, a to u nemocného léčeného rituximabem v monoterapii.

S ohledem na dobrou korelaci dosavadních laboratorních a klinických šetření je možno předpokládat, že obdobné sledování u dostatečně velkého souboru pacientů by mělo vést k závěrům o uplatnitelnosti metodiky při terapeutických rozhodováních.

Tato práce je podporována grantem č. 203580, 15/01 GA UK.

SYNTEZA NOVÝCH DERIVÁTŮ SILYBINU S MODIFIKOVANÝMI BIOLOGICKÝMI A FYZIKÁLNÍMI VLASTNOSTMI

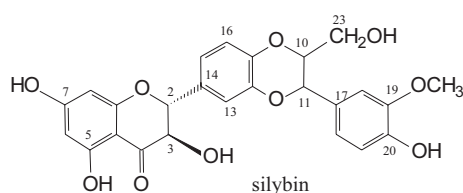
**R. GAŽÁK^a, DANA WALTEROVÁ^b,
PETR SEDMERA^a a VLADIMÍR KŘEN^a**

^aLaboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Václavská 1083, 142 20 Praha, ^bÚstav lékařské chemie a biochemie, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
e-mail: gazak@biomed.cas.cz

Flavanolignan silybin, izolovaný ze semen ostropestřce mariánského, je aktivní složkou řady hepatoprotektivních a cytoprotektivních přípravků. Silybin vykazuje silné antioxidační a antiradikálové účinky. Přírodní silybin je ekvimolární směsí dvou velmi obtížně separovatelných diastereoisomerů (2R, 3R, 10S a 2R, 3R, 10R, 11R). Jeho biologická dostupnost je omezena nízkou rozpustností ve vodě.

V rámci této práce se řeší dva základní přístupy pro zlepšení biologické dostupnosti silybinu: selektivní oxidace primární hydroxylové skupiny silybinu na skupinu karboxylovou, spočívající ve zvýšení rozpustnosti ve vodě a konjugace silybinu s dalším antioxidantem (např. kyselinou gallovou) vedoucí ke zvýšení antioxidačních a antiradikálových účinků.

Selektivní methylace jednotlivých hydroxylových skupin silybinu (resp. jeho 2,3-dehydro derivátu) a následné biologické testování těchto látek by mělo objasnit roli konkrétních funkčních skupin v molekulárních mechanismech antioxidačních účinků silybinu.



Vzhledem k polyfunkčnímu charakteru molekuly silybinu je nezbytné pro většinu transformací vycházet ze selektivně chráněných derivátů. Z tohoto důvodu je součástí projektu také vývoj metod selektivního chránění v molekule silybinu (popř. 2,3-dehydrosilybinu).

Cílem práce je příprava derivátů silybinu s modifikovanými vlastnostmi, především pak derivátů s lepší biodostupností a zvýšeným a/nebo cíleným antioxidačním účinkem.

Práce byla podporována granty č. 303/02/1097 GA ČR, č. FD-K/096 MPO ČR a č. AV0Z5020903.

MAPOVÁNÍ KONTAKTNÍCH MÍST MEZI RECEPTORY III. SKUPINY GPCR A G-PROTEINY

**M. HAVLÍČKOVÁ, JAROSLAV BLAHOŠ,
L. PREZEAU a J.-P. PIN**

Oddělení molekulární farmakologie, UEM, Václavská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: michavl@seznam.cz

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických i patologických procesech a proto jsou jejich struktura a funkce předmětem intenzivního výzkumu. Řada experimentů prokázala, že GPCR se mohou vyskytovat jako konstitutivní nebo indukované homo- či heterodimery. Dimerizace podstatně ovlivňuje vlastnosti nově vzniklých receptorů např. jejich farmakologické vlastnosti, interakci s G-proteiny, desensitizaci, internalizaci a buněčný transport.

Pro určení strukturního a funkčního uspořádání komplexu dimerní receptor-G-protein je nezbytné zjistit, jestli G-proteiny interagují s oběma podjednotkami receptoru, nebo zda je pouze jedna z podjednotek dimeru zodpovědná za aktivaci asociovaného G-proteinu. Jako model jsme použili GABABR (receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu), který je tvořen dvěma různými podjednotkami GABABR1 a GABABR2. Mutace provedené v intracelulárních kličkách obou podjednotek prokázaly, že podjednotka GABABR2, konkrétně její druhá intracelulární klička, je nezbytná pro aktivaci G-proteinů. Testování chimerních podjednotek receptoru obsahujících mutace intracelulárních domén naznačilo, že jediná podjednotka homodimerních receptorů obsahuje všechny determinanty nezbytné k aktivaci G-proteinů. Dále jsme se soustředili na určení oblastí, které jsou zodpovědné za specifickou interakci mezi receptorem a α -podjednotkou G-proteinu. V tomto případě byly použity mGluRs (metabotropní glutamátové receptory), které patří do III. skupiny GPCR stejně jako GABABR, ale funkční mGlu receptor je tvořen dvěma identickými podjednotkami. Využili jsme rozdílných schopností mGluR2 a mGluR8 aktivovat chimerní Gqo5 a Gqz5 proteiny a zjistili jsme, že sekvence druhé intracelulární kličky těchto receptorů specificky interaguje s C-koncem Ga-podjednotky (posledních 5 aminokyselin). Tato interakce je zodpovědná za selektivní rozpoznání Go/z-proteinů mGlu receptory II. a III. třídy a určuje, který typ G-proteinů bude aktivován.

Získané výsledky naznačují, že C-konec Ga-podjednotky interaguje místem na receptoru, které je tvořeno druhou a pravděpodobně třetí intracelulární kličkou, stejně jako je tomu u I. skupiny GPCR. Je tedy možné, že u těchto dvou skupin dochází k aktivaci G-proteinů stejným způsobem.

Tento projekt byl podporován GA ČR (301/00/0654), IGA MZČR (NF 6704-3/01).

MUTATIONS IN CKII BLOCK FEMALE GAMETOPHYTE DEVELOPMENT IN *Arabidopsis thaliana*

JAN HEJÁTKO^{a,c}, MARKÉTA PERNISOVÁ^b,
PETRA TÄNZLER^c, KLAUS PALME^c,
and BŘETISLAV BRZOBOHATÝ^{a,b}

^a*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, ^bDepartment of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cMax-Planck-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft, Carl-von-Linne Weg 10, D-508 29, Köln, Germany*
e-mail: hejatk@sci.muni.cz

Homologues of bacterial two-component signal transduction elements are emerging key players in signaling of plant hormones like ethylene and cytokinin. In *Arabidopsis thaliana* the family of sensor histidine kinases consists of at least 11 genes. CKII is a member of this large gene family. CKII was first identified by activation tagging resulting in cytokinin independent growth and differentiation of *Arabidopsis calli*. It has been suggested that CKII may play a role in cytokinin perception, however, its biological function remains elusive. We identified an En-1 insertion knockout mutant in CKII. In progeny of the CKII/cki1::En-1 plants segregated the cki1::En-1 (cki1-i) allele in a non-Mendelian manner suggesting a loss of function in a gamete carrying the cki1-i. The mutant displayed a semi-sterile silique phenotype. Reciprocal backcrosses revealed that female gametophyte development is fully blocked by the mutation. Detailed analysis of the mutant female gametophyte disclosed a defect in a later phase of embryo sac development, leading to central vacuole decomposition and subsequent progressive degradation of the female gametophyte constituents. By screening for semi-sterile silique phenotype in the segregating CKII/cki1-i population we identified a wild type revertant line bearing a silent mutation in the CKII gene as a result of an En-1 excision. Independent En-1 excision events resulted in two additional, stable loss of function mutations in the CKII gene (cki1-s1 and cki1-s2). Analysis of all mutant alleles suggests that the mutant phenotype clearly links to the En-1 insertion in CKII and indicates an essential role of CKII in regulation of female gametophyte development. To analyze the expression of CKII we constructed two different fusions of a putative CKII promoter region with a uidA gene. Histological analysis of GUS activity in stable transformants harboring these fusions, and *in situ* mRNA hybridization analysis of the CKII gene expression pattern suggest a novel complex role for CKII throughout

entire female gametophyte development and in early seed development.

Supported by grants LN00A081, MSM143100008, Z5004920. J. H. was supported by DAAD.

STANOVENÍ HLADINY APOPTÓZY INDUKOVANÉ POMOCÍ JEDNOTLIVÝCH C-KONCOVÝCH ISOFOREM PROTEINU p73 V BUNĚČNÝCH LINIÍCH EXPRIMUJÍCÍCH RŮZNÉ KONFORMAČNÍ ISOMERY PROTEINU p53

R. HRSTKA, P. MÜLLER, P. ČEŠKOVÁ
a B. VOJTĚŠEK

Základna experimentální onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Protein p53 může být indukován a stabilizován poškozením DNA, hypoxií, defekty mitotického vřeténka, popřípadě aktivací onkogenů nebo virů. Aktivovaný protein p53 může vyvolat apoptózu, zástavu buněčného cyklu a v některých případech i senescenci.

Funkce proteinu p53, zejména při navození apoptózy, je významně ovlivněna expresí různých isoform jeho homologu, proteinu p73. Předpokládá se, že každá z isoform proteinu p73 kombinující různý N-koncový a C-koncový sestřih vykazuje rozdílné transaktivační a protein–protein interakční schopnosti, a tak společně s proteinem p53 vytváří regulační síť, která může velice jemně reagovat na aktuální stav buňky.

Buněčné linie H1299, MCF-7, T47D, BT474 a BT574 byly transfekovány expresními plazmidy s vloženými sekvencemi jednotlivých delečních forem proteinu p73 (alfa, beta, gamma, delta) a proteinu p53. Transaktivační schopnost různých isoform proteinu p73 a jejich schopnost indukovat apoptózu byla porovnávána ve vztahu k různým typům mutací proteinu p53. Úroveň apoptózy byla měřena u buněčných linií exprimujících jednak wild-type p53 a jednak různé mutanty p53 lišící se DNA vazebnou kapacitou a typem konformace DNA vazebné domény.

Naše výsledky jednoznačně potvrzují vliv vlastního buněčného prostředí, typu tkáně, statutu proteinu p53 a isoform proteinu p73 na proces programované smrti buněk, přičemž existence spolupráce mezi p73 a p53 je pravděpodobně nezbytná. Pokud by se podařilo v dané nádorové linii specificky aktivovat některou z isoform vyvolávajících apoptózu, popřípadě inaktivovat mutovanou formu p53, bylo by možné uvažovat i o speciální cílené terapii.

Tato práce byla podporována grantovým projektem IGA MZ ČR číslo 6404-3.

ÚLOHA ALTERNATIVNÍHO SESTRÍHU PŘI DIMERIZACI METABOTROPNÍCH GLUTAMÁTOVÝCH RECEPTORŮ

**BOHDANA HRUŠKOVÁ, ALICE ZIKOVÁ
a JAROSLAV BLAHOŠ**

*Oddělení molekulární farmakologie, Ústav experimentální
medicíny, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083,
142 00 Praha 4*

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) jsou největší skupinou buněčných receptorů reagujících na obrovskou škálu ligandů včetně mnohých léčiv. Proto je odhalení principů a mechanismů přenosu signálu (rozpoznání ligandu, aktivace receptoru, přenos signálu do buňky) důležité pro porozumění fyziologickým procesům na molekulární úrovni a tím pro vývoj nových léčiv.

Metabotropní GABAB receptor patří do třetí rodiny GPCRs. Funguje jako heterodimer složený z podjednotek GB1 a GB2. Podjednotka GB1 je zodpovědná za vazbu ligandu (*N*-konec) a aktivaci receptoru a podjednotka GB2 aktivuje G-proteiny. Pro funkčnost receptoru je ovšem důležitá interakce mezi oběma podjednotkami. Této vlastnosti jsme využili pro studium úlohy *C*-koncové části metabotropního glutamátového receptoru (mGluR1) při dimerizaci. Tento receptor je homodimerní, patří také do třetí rodiny GPCRs a s GABAB receptorem sdílí sekvenční homologii. mGluR1 existuje v několika variantách vznikajících alternativním sestřihem mRNA. Jednotlivé varianty mají různě dlouhé *C*-konce. mGluR1a varianta (dlouhá) je lokalizována v dendritech a těle neuronu a mGluR1b (krátká) je lokalizována v axonu a těle. Některé studie popisují vliv alternací *C*-konce na funkční vlastnosti receptoru a také dimerizaci mGluR1 alternativních variant.

Abychom tuto problematiku mohli studovat, vytvořili jsme GABAB/mGluR1 receptorové mutanty, jejichž *N*-konce a transmembránové domény pochází z GB1 či GB2 podjednotky GABAB receptoru a *C*-koncové části odpovídají mGluR1a nebo mGluR1b. Sledovali jsme, jaký vliv má *C*-konec na dimerizaci receptoru, transport na buněčný povrch a na funkci dimerních receptorů. Naše výsledky naznačují, že samotný *C*-terminus mGluR1 receptoru neovlivňuje dimerizaci mGlu receptorů, alespoň v experimentech s transfekovanými HEK293 (human embryonic kidney) buňkami.

Sponzorováno GA ČR 301/00/0654, IGA MZ NF 6704-3/01.

PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍHO LIDSKÉHO ERYTROPOETINU V SAVČÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH A TRANSGENNÍCH ZVÍŘATECH

**J. KALANINOVÁ^a, L. ČERMÁKOVÁ^a,
M. MAREŠOVÁ^a, M. POPLŠTEJN^b,
D. KOŽELOUHOVÁ^a, T. MIKUŠ^{a,b}
a P. MALÝ^a**

^aOddělení savčího vývoje, ÚMG, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^bBiopharm VÚBVL, a.s.

Lidský erythropoetin (hEPO) je cytokín glykoproteinové povahy stimulující přeměnu pluripotentních zárodečných buněk v kostní dřeni na proerythroblasty, jejich další růst a dozrávání, syntézu hemoglobinu a uvolňování do krevního oběhu ve formě zralých erytrocytů.

Komplementární DNA (cDNA) lidského erythropoetinu získanou izolací z fágové cDNA knihovny jsme subklonováním vpravili do plazmidových DNA vektorů. K překonání obtíží s izolací terapeutických proteinů z mléka transgenních zvířat ověřujeme metodu produkce histidinovou kotvou (6xHis) značených proteinů. Upravená sekvence pro 6xHis-EPO s modifikací na *N*- i *C*-konci molekuly byla vpravena do expresního vektoru pro produkci rekombinantního hEPO v savčích buňkách. Takto připravené savčí expresní vektory byly transfekovány elektroporací do COS-7 buněk. Z těchto savčích kultur byla provedena izolace produktů Ni-NTA technologií – technikou IMAC a test proliferační aktivity.

Pro cílenou transgenní expresi 6xHis-modifikovaného hEPO v mléčné žláze králíka jsme zkonstruovali „rekombinantní transgenní vektor“, nesoucí cDNA pro hEPO s 6xHis kotvou na *C*-konci, který se v současné době injikuje do králíčích embryí.

Grant MPO ČR, reg. č. FB-C2/24, 1999–2001, grant MPO ČR, reg. č. FD-K/052, 2001–2003.

ACTIVATION OF LIPASE FROM *Geotrichum candidum* AND ITS ENANTIOSELECTIVITY TOWARDS XENOBIOTIC SUBSTRATES

**ZDENĚK KEJÍK^a, MARIE ZAREVÚCKA^b,
and KATEŘINA DEMNEROVÁ^a**

*^aInstitute of Chemical Technology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, ^bInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6
e-mail: zarevucka@uochb.cas.cz*

Convenient procedures were developed for stimulation of lipase activity with specificity towards natural polyunsaturated fatty acids. Four strains of *Geotrichum candidum* were tested during this study. Lipase activity was determined and proved in the used strains, and for majority of tested media. Olive oil was employed as activator for the determination of the lipase activity. Calculated differences in lipase activity

values were used as basis for optimizing of fermentation conditions. Majority of activated lipases represented extracellular lipases, which penetrated through cellular membrane into the medium containing activator. The activity of intracellular lipases was determined as well. To evaluate different media, that one containing peptone as nitrogen source was proved to be the best one of the tested series of media. The most remarkable growth of the cell biomass was also observed using this medium. The highest specific activity of all activated lipases was found in the second half of the period of exponential (log) phase cultures. These lipases were used as biocatalysts of the hydrolytic resolution of racemic *cis*- and *trans*-isomers of 2-(4-methoxybenzyl)cyclohexyl acetates¹. Enantiomeric purity and absolute configuration of the products, chiral isomers of 2-(4-methoxybenzyl)cyclohexanol, were studied. These lipases are also expected to be used for enrichment of polyunsaturated fatty acids, especially α -linolenic and γ -linolenic acid, in different fractions obtained by enzyme-mediated hydrolysis of blackcurrant oil.

The authors thank Ministry of Education of the Czech Republic for financial support of this research through the COST D13.10 project, a part of the COST D13/0014/01 network.

REFERENCES

1. Zarevúcka M., Žalská Z., Rejzek M., Streinz L., Wimmer Z., Macková M., Demnerová K.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 17, 866 (1995).

AKUMULACE RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH ANALOGŮ SOMATOSTATINU V LEDVINÁCH POTKANA

**M. KOPECKÝ^a, P. NACHTIGAL^a, V. SEMECKÝ^a,
A. LÁZNÍČKOVÁ^b, M. LÁZNÍČEK^c,
F. TREJTNAR^c a C. DECRISTOFORO^d**

^aKatedra biologických a lékařských věd, ^bKatedra biofyziky a fyzikální chemie a ^cKatedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze, ^dDepartment of Nuclear Medicine, University Hospital Innsbruck, Austria

Radioaktivně značené analogy somatostatinu používají k diagnostice a léčbě některých neuroendokrinních nádorů (např. karcinoidů). Akumulace v ledvinách a případná nefrotoxicita limituje jejich širší využití v humánní medicíně. Předpokládá se, že tyto peptidy jsou kumulovány v proximálních tubulech ledvin mechanismem tubulární reabsorpce. Cílem této práce bylo přispět k objasnění mechanismů jejich zadržet v ledvinách.

V průběhu experimentu byly zkoumány distribuční a eliminační charakteristiky 99mTc-oktreotidu a 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotidu po i.v. podání potkanům kmene Wistar. 99mTc-oktreotid byl pouze minimálně zadržován v ledvinách a do moči bylo během 48 hodin vyloučeno 15 % podané dávky. 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotid byl vylučován převážně močí (více než 75 % podané dávky) a byl silně

kumulován v ledvinách i 48 hodin po podání. V modelu perfúze izolované ledviny byla renální clearance 99mTc-oktreotidu třikrát menší než clearance 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotidu. Mikroautoradiografická analýza 99mTc-oktreotidu ukázala, že tento peptid byl přítomen v glomerulárních kapilárách a cévách mezi ledvinnými tubuly. Naproti tomu 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotid byl detegován převážně v ledvinné dřeni v buňkách sběracích kanálků a v okolní intersticiální tkáni, slabá pozitivita byla pozorována v proximálních a distálních tubulech. Pomocí *in vitro* autoradiografie byla v ledvinné tkáni prokázána přítomnost somatostatinnových receptorů.

Předpokládáme, že rozdílná distribuce a eliminace těchto peptidů souvisí s jejich odlišnými fyzikálními vlastnostmi a jejich rozdílnou afinitou k somatostatinným receptorům. 99mTc-oktreotid je v porovnání s 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotidem lipofilnější, je vylučován převážně přes gastrointestinální trakt a navíc přímé značení 99mTc vede ke snížení afinity k somatostatinným receptorům. 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotid reprezentuje skupinu somatostatinnových analogů, které jsou převážně vylučovány močí. Má vysokou afinitu k somatostatinným receptorům. Mechanismus retence 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotidu v ledvinách nelze vysvětlit pouze jako důsledek tubulární reabsorpce peptidu v proximálních tubulech ledviny, ale vzhledem ke kumulaci 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotidu v ledvinné dřeni předpokládáme, že se na akumulaci těchto látek v ledvinách podílejí také další mechanismy. Svoji roli během vychytávání 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr3-oktreotidu mohou hrát somatostatinnové receptory, které jsou přítomny ve sběracích kanálkách ve dřeni ledvin.

Tato práce vznikla za podpory GA UK (č. 159/2001) a MŠMT (č. 11600002).

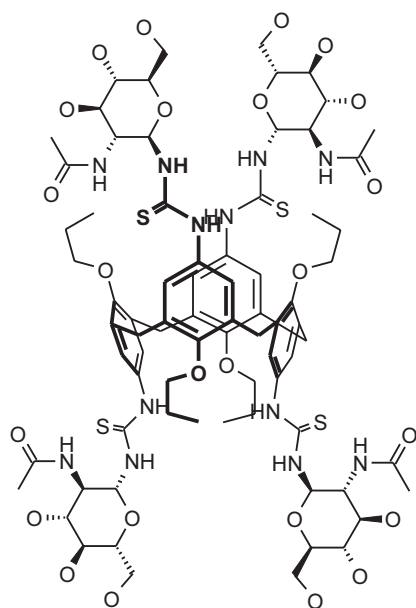
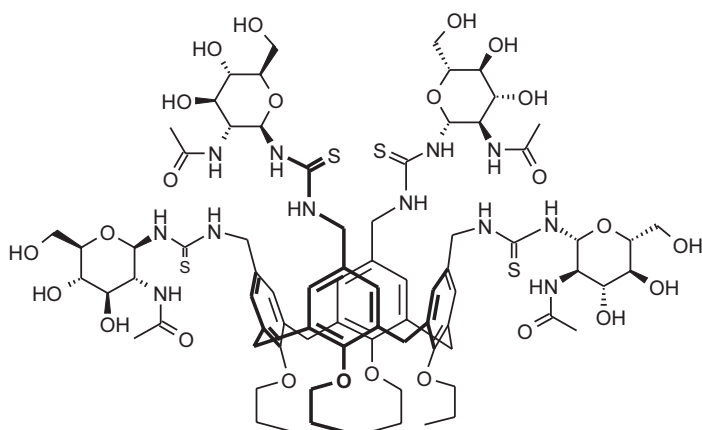
GLYKOMIMETIKA NA BÁZI CALIX[4]ARENŮ

**KAREL KŘENEK^{a,b}, K. VÁCLAVÍKOVÁ^b,
VLADIMÍR KŘEN^a a IVAN STIBOR^b**

^aLaboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^bÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Calix[n]areny spolu s porfyriny, cyklodextriny, crown ethery a kryptandy patří v poslední době mezi nejběžnější molekuly používané ke konstrukci supramolekulárních systémů, které mají zajímavé fyzikálně chemické i biologické vlastnosti.

Deriváty *N*-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranos mají vysokou afinitu k aktivačnímu receptoru krysích, příp. lidských lymfocytů, NK buněk (NKR-P1 receptory). Po otestování aktivity monosacharidických ligandů jsme přistoupili k syntéze polyvalentních molekul na bázi glykokonjugátů a glykodendrimerů, které se vyznačují o několik řádů vyššími aktivitami než samotné nízkomolekulární ligandy. Příprava těchto látek je předurčena faktem, že aktivační receptor NK-buněk má dvě aktivní místa, a proto k dosažení vyšší afinity je vhodné připravit polyvalentní sacharidické deriváty. Lipo-



filní calixaren by měl zajistit silnou interakci s membránou cílových buněk.

Hlavní náplní této práce je syntéza neoglykokonjugátů calix[4]arenů s *N*-acetamido-2-deoxy- β -D-glukózou. Možnost volby konformace calixarenu umožňuje volbu různého uspořádání vazebných míst cukerných substituentů. Substitucí spodního okraje calixarenového skeletu a změnou spaceru spojující cukr s calixarenem můžeme regulovat rigiditu celé molekuly a tak změnit afinitu glykokonjugátu k receptoru NK-buněk.

Práce byla podpořena granty GA ČR 203/01/1018 a VZMBÚ č. AV025020903.

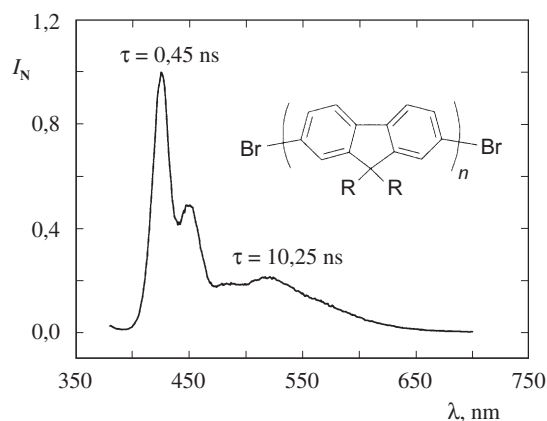
SYNTEZA A STUDIUM LUMINISČENČNÍCH VLASTNOSTÍ NOVÝCH MATERIÁLŮ NA BÁZI FLUORENU

STANISLAV KUKLA

Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6

Elektroluminiscentní polymerní materiály se během posledních deseti let dostaly do popředí zájmu organických chemiků i fyziků. Z celé řady konjugovaných polymerů se jako velmi slibná skupina materiálů z hlediska odolnosti vůči chemické a termické degradaci jeví polyfluoreny (PF). Jejich nevýhodou je agregace řetězců v pevné fázi a vznik excimerové emise, která nepříznivě ovlivňuje optické charakteristiky a životnost polymerních světlo emitujících diod (PLED).

Dvoustupňovou syntézou byly připraveny 9,9-dialkyl-2,7-dibromofluoreny ($R = C_{10}H_{21}$, $C_{16}H_{33}$, $C_{22}H_{45}$), jejichž polymerizace (Yamamotova aryl-aryl coupling reakce katalyzovaná komplexem niklu) poskytla dobře charakterizované oligomerní PF. Různé stupně polymerizace, stanovené metodou SEC, byly vysvětleny na základě vlivu délky alkylových substituentů na průběh reakce. Pro ověření struktury monomerů i PF byly použity standardní metody strukturní analýzy: EA, IČ, 1H NMR a LR-COSY (1H - 1H) spektroskopie.



Obr. 1. Fotoluminiscenční emisní spektrum PF ve filmu; I_N – normalizovaná intenzita

PF mají podél hlavního řetězce *p*-konjugovaný systém elektronů, jemuž vděčí za zajímavé optoelektronické vlastnosti. Nalezené kvantové výtěžky modré emise (maximum 415 nm, doba života 0,45 ns, 3 vibrační pásy) PF v roztoku THF se pohybovaly v rozmezí 0,82–0,97. Luminiscenční měření (obr. 1) ve filmu naneseném na křemenné sklíčko rotačním nanášením z roztoku toluenu (koncentrace 15 mg·ml⁻¹, 800 ot·min⁻¹) prokázala, že delší alkylové postranní řetězce brání agregaci řetězců PF v pevné fázi a tím i vzniku excimerové emise (maximum 520 nm, doba života 10 ns, široký pás). Elektroluminiscence byla měřena na PLED s jednou polymerní vrstvou (struktura ITO/PF/Al) a její externí kvantový výtěžek byl 0,01 %.

NOVÝ TYP KAPALNÝCH KRYSTALŮ S BENZOTHIOFENOVÝM JÁDREM

MILAN KURFÜRST^a, JIŘÍ SVOBODA^a,
VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b,
MILADA GLOGAROVÁ^b a PŘEMYSL VANĚK^b

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bFyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
e-mail: milan.kurfurst@vscht.cz, jiri.svoboda@vscht.cz

Organické kapalně krystaly jsou známy již více než sto let, většího významu však dosáhly až v posledních třiceti letech. Jejich využití zahrnuje široké spektrum aplikací, především v zobrazovacích jednotkách a v elektronických prvcích.



Schéma 1

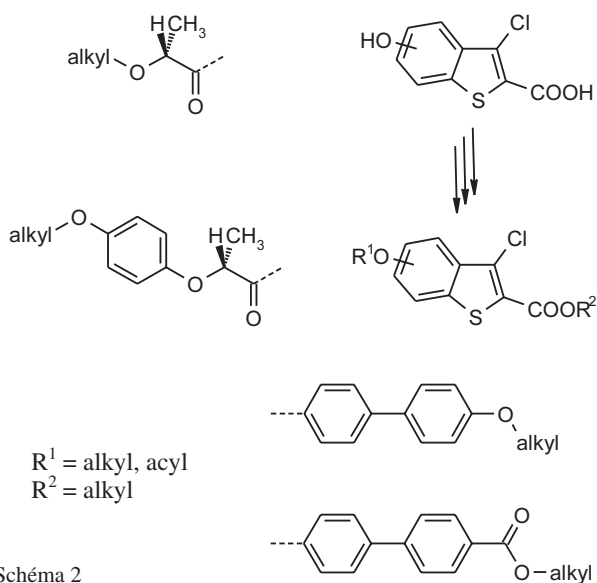


Schéma 2

V rámci našeho systematického výzkumu v oblasti syntézy a materiálového využití benzokondenzovaných heterocyklů jsme se zaměřili na přípravu potenciálních kapalných krystalů obsahujících benzothiofenový systém jako centrální jednotku a studium jejich vlastností.

Byla syntetizována 5-hydroxy- a 6-hydroxybenzo[*b*]thiofen-2-karboxylová kyselina nesoucí atom chloru jakožto laterální substituent v poloze 3 (schéma 1)

S použitím vhodných chránících skupin byla heterocyklická jádra dále derivatizována připojením alkylového nebo acylového řetězce, vložením chirálního prvku a prodloužením jádra o bifenylové uskupení (schéma 2).

Syntetizovali jsme tak sérii látek s různými postranními řetězci a sledovali jejich fyzikální vlastnosti. Měření ukázala výskyt různých mesofází, především pak žádané feroelektrické SmC fáze.

Projekt výzkumu byl podporován granty GA ČR č. 106/00/0582 a 202/02/0840.

DETEKCE CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ U NEMOCNÝCH S LEUKÉMIEMI METODOU KOMPARATIVNÍ GENOMOVÉ HYBRIDIZACE

Š. KURKOVÁ^a, J. BŘEZINOVÁ^a,
Z. ZEMANOVÁ^b, L. ŠINDELÁŘOVÁ^b,
B. RYPÁČKOVÁ^c a K. MICHALOVÁ^{a,b}

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, ^bCentrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD, VFN a 1. LF UK, ^cI. interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha
e-mail: kurkova@uhkt.cz

Nízká proliferace schopnost *in vitro* limituje u nádorových buněk úspěšnost konvenční cytogenetické analýzy. Toto vyšetření proto doplňujeme molekulárně-cytogenetickými metodami, tj. různými modifikacemi fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), ke kterým patří i komparativní genomová hybridizace (CGH). Metoda CGH deteguje změny v počtu DNA sekvencí mezi nádorovou DNA a kontrolní DNA. DNA izolovanou z nádorových buněk značíme pomocí fluorochromu Spectrum Green a kontrolní DNA je značena Spectrum Red. Obě DNA kohybridizují k normálním metafázním chromozomům. Hybridizace je detegována ve fluorescenčním mikroskopu a pomocí speciálního softwaru je následně intenzita jednotlivých fluorochromů. Na základě změny poměru intenzit obou fluorescenčních signálů program určí oblasti zmnožení nebo ztráty DNA sekvencí ve smyslu amplifikace nebo delecce. Příslušná místa změn se projeví změnou barvy homologních chromozomů (amplifikace zeleně, delecce červeně).

Na našem pracovišti používáme tuto metodu k vyšetření nemocných s chronickou lymfatickou leukémií (CLL), akutní myeloidní leukémií (AML) a u nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS). U všech těchto pacientů provádíme klasickou cytogenetickou analýzu buněk kostní dřeně a FISH. Z 11 nemocných s CLL jsme u 7 potvrdili metodou CGH normální karyotyp. U dvou nemocných jsme pomocí CGH ověřili přítomnost již dříve nalezených chromozomo-

vých změn. U dalších dvou pacientů s normálním cytogenetickým nálezem potvrzeným i metodou FISH, jsme pomocí CGH našli submikroskopickou chromozomovou aberaci: duplikaci 2p [dup(2p)] u jednoho a delecii 19q [del(19q)] u druhého nemocného. U pacienta s MDS, u kterého jsme při klasickém cytogenetickém vyšetření našli rozsáhlé změny karyotypu, jsme pomocí FISH, mnohobarevné FISH (mFISH) a CGH potvrdili komplexní karyotyp: 46,XY,-5, del(7),+8, der(12)t(5;12).

Metoda CGH umožňuje určit amplifikaci a delecii DNA v buňkách. Nelze jí ale použít pro detekci balancovaných změn nebo přestaveb přítomných pouze v malém buněčném klonu. Proto jen vhodnou kombinací molekulárně-cytogenetických metod, tj. FISH, interfázické FISH (I-FISH), mFISH a CGH, které doplňují klasickou cytogenetickou analýzu, lze přesně detegovat všechny chromozomové aberace v nádorových buňkách.

Tato studie je podpořena granty: NC 6470-3, GA ČR 301/01/0200, CEZ:J/13/98 1111 0000 4 MŠMT ČR.

TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO DRASLÍK V *Saccharomyces cerevisiae*

LYDIE MAREŠOVÁ a HANA SYCHROVÁ

*Oddělení membránového transportu, Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: lydie@biomed.cas.cz*

Transport substrátu přes biologickou membránu je proces potřebný v mnoha životních funkcích buněk – od přísunu živin přes regulaci koncentrace metabolitů a homeostáze iontů až k vylučování toxických komponent z cytoplazmy. Zvláště u jednobuněčných organismů je životně důležité, aby buňka byla schopna aktivně regulovat výměnu látek s okolním prostředím. Jako modelový organismus pro studium membránových přenašečů byla zvolena kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, hlavně díky krátké generační době, nenáročné kultivaci, kompletně osekvenovanému genomu a dostupnosti různých mutantních kmenů.

V posledních letech byly popsány mnohé transportní systémy této kvasinky. Předpokládá se, že počet proteinů účastnících se na transportu malých molekul přes membrány je asi 320, tj. 6 % proteomu. Funkce některých z nich byla ovšem pouze předpokládána na základě sekvenční podobnosti s transportérem již dříve charakterizovaným. Takové systémy je potom třeba dodatečně funkčně charakterizovat.

Příkladem transportního proteinu s předpokládanou funkcí na základě sekvenční podobnosti s transportními systémy pro antiport alkalických kationtů proti protonům v *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis* a *Escherichia coli*. Díky známé sekvenci mohl být gen disruptován homologickou rekombinací. Porovnáním fenotypu mutantního kmene s rodičovským byla pak navržena funkce, tedy antiport K⁺ (z buněk ven) proti protonům (do buněk).

Správnost této hypotézy je ovšem nutno potvrdit zpětným vnesením genu KHA1 ve vhodném vektoru do buněk postrádajících gen vlastní. Součástí naší práce je tedy konstrukce

plasmidových vektorů s genem KHA1 za různě silnými promotory. Těmito vektory jsme transformovali kmeny Dkha1. Podle dosavadních výsledků se ovšem zdá, že fenotyp delečních mutantů popsáný v originální publikaci možná nebyl způsoben pouze delecí KHA1. Dále jsme pozorovali lokalizaci proteinu Kha1 značeného fluorescenčním proteinem GFP v buňkách. Gen z mnohokopiových vektorů je exprimován ve velké míře a následně lokalizován ve většině buněčných membrán. Pro určení lokalizace za přirozených podmínek bude nutno snížit množství syntetizovaného proteinu, nejlépe expresí z centromerového vektoru.

Kmeny s disruptovanými vlastními geny pro přenašeče draslíku jsou zároveň vhodnými nástroji pro charakterizaci obdobných proteinů z vyšších eukaryot. V blízké budoucnosti se chystáme transformovat kvasinky knihovnou cDNA živočišných buněk. Podaří-li se selektovat klony s funkčním živočišným přenašečem pro draslík, umožní to jeho studium mikrobiologickými a molekulárně biologickými metodami za přísně regulovaných podmínek bez potřeby živočišných tkáňových kultur.

COMPARATIVE GENOMICS OF PATHOGENIC *Treponema pallidum* SUBSPECIES

**PETRA MATĚJKOVÁ^a, DAVID ŠMAJS^a,
STEVEN J. NORRIS^b,
and GEORGE M. WEINSTOCK^c**

^aDepartment of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Joštova 10, 662 43 Brno, ^bDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas, Houston Medical School, 6431 Fannin Street, Houston TX 77030, ^cHuman Genome Sequencing Centre, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Alkek N1519, Houston, TX 77030, USA

Spirochaetal genus *Treponema* includes several pathogenic spirochetes (e.g. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* is the causative agent of syphilis, *T. pallidum* subsp. *pertenue* causes yaws). Recent serological tests are negative in early stages of treponemal infection and cannot distinguish between syphilis and yaws. The complete genome sequence, construction of a microarray chip with all 1039 predicted ORF PCR products, together with the findings that there is a high degree of sequence homology among pathogenic treponemes, enables comparative genomic analyses based on DNA-microarray techniques. Identification of chromosomal sequences specific for these pathogens can be used for selective PCR diagnostics of treponemal diseases. DNA of *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain was compared to DNA isolated from three different strains of *T. pallidum* subsp. *pertenue* (strain Gauthier, Samoan D, CDC-2). As a result of DNA microarray comparisons, 26 genes (10 with stronger and 8 with weaker signal in *pertenue* strains and 8 control genes with similar signal in both subspecies examined) were selected and sequenced. Altogether, 23879 nucleotides (2.1 % of the genome) were sequenced in 3 *pertenue* strains and control Nichols. No region of extensive sequence heterogeneity was detected. However, 15 different single nucleotide polymorphisms (SNPs)

were identified: 3 SNPs in Gauthier strain, 13 in Samoan D and 14 SNPs in CDC-2. Ten (out of 15) SNPs cause amino acid changes. SNPs common for all pertenuae strains as well as SNPs specific for each individual strain will allow to use these nucleotide polymorphisms to design sequence-specific PCR diagnostics of these strains.

VLIV TYPU MATRICE A MNOŽSTVÍ CHELATUJÍCÍCH SKUPIN V PSEUDOAFINITNÍ CHROMATOGRAPHII NA IMOBILIZOVANÝCH KATIONTECH KOVŮ (IMAC)

KATEŘINA MĚSZÁROSOVÁ^{a,b},
GALINA TIŠČENKO^a a MIROSLAV BLEHA^a

^aÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6, ^bFakulta přírodovědecká, Karlova univerzita, Albertov 6, 120 00 Praha 2

Nové sorbenty pro pseudoafinitní chromatografii na imobilizovaných kationtech kovů (IMAC) byly připraveny z terpolymerních prekurzorů kovalentním připojením chelatujících skupiny – kyseliny iminodioxové (IDA). Bylo stanoveno množství navázaných chelatujících skupin a porovnáno s množstvím chelatovaných kationtů Ni²⁺ a Cu²⁺. Byl sledován vliv porozity částic na kapacitu sorbentů při přímé modifikaci kyselinou iminodioxovou a při nepřímé modifikaci esterem IDA s následnou hydrolyzou.

Terpolymerní prekurzory ve formě kulovitých částic velikosti 100–250 µm s rozdílnou porozitou byly připraveny z monomerů glycidyl-methakrylátu (GMA), diethylen-methakrylátu (DEGMA) a ethylen-dimethakrylátu (EDMA) suspenzí radikálovou polymerizací.

Na nikelnatých komplexech připravených sorbentů byla metodou frontální chromatografie studována přístupnost komplexů pro interakci s imidazolem, analogem histidinu, který je nejvíce zodpovědný za tvorbu koordinační vazby imobilizovaného kovu s bílkovinou.

Porovnáním frontálních chromatografických křivek byla vyhodnocena schopnost sorbentů tvořit koordinační vazby s dusíkovým atomem imidazolového kruhu a byly analyzovány kinetické vlastnosti sorbentů za dynamických podmínek. Teoretické závěry byly prakticky ověřeny studiem afinity specifického imunoglobulinu, IgG1 proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu, k připraveným sorbentům.

STUDY OF THE SPECIFICITY OF DIFFERENT ACYL-CoA OXIDASES OF THE YEAST *Yarrowia lipolytica* expressed IN *E. coli* AND *Yarrowia lipolytica*

KATEŘINA MLÍČKOVÁ

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 11, 78 371 Olomouc

Due to its ability to produce different metabolites such as citrate, and to secrete numerous proteins, the yeast *Yarrowia*

lipolytica has been used in industrial processes. It is also able to grow on and degrade alkanes and to use fatty acids as carbon sources, which makes it a promising tool for biotechnological uses. Its capacity to degrade oils of different origins makes it a potential de-polluting agent. The degradation products often serve as precursors of aromatic compounds (γ-decalactone with peach flavor).

Degradation of alkanes involves three enzymatic steps in endoplasmic reticulum to produce a fatty acid. Similarly, degradation of triglycerides is performed by secreted lipases which release the corresponding fatty acids, which are then metabolized via β-oxidation.

The initial step of peroxisomal β-oxidation is catalyzed by the acyl-CoA oxidases (Aoxs) encoded by the POX genes. *Y. lipolytica* POX set is the most complex among the yeasts studied to date, as it comprises five different genes encoding Aoxs.

Functions of different acyl-CoA oxidases have been investigated by successive gene disruptions (construction of mono-, bi-, tri- and tetradisruptants). These genes encode for proteins exhibiting different specificities with respect to the chain lengths of the acyl-CoA substrates. Aox3p and Aox2p from *Y. lipolytica* were bacterially expressed, purified and their activity as a function of substrate chain length was established. Using DNA shuffling techniques, we have also constructed chimeras between Aox2p and Aox3p which are exhibiting activity with a broad spectrum of substrates, according to the chain length. However, a precise knowledge of the kinetic properties of the different acyl-CoA oxidases is still lacking.

Eleven acyl-CoA oxidase chimeras (11 different yeast strains) were grown on medium containing oleic acid as a sole carbon source (concentrations of OA varied from 0,1–5 %). Two different growth trends were distinguished (by OD600 and dry weight biomass determination). Cellular, medium and surface lipid composition during the growth was analyzed using hexane or chloroform-methanol extractions, TLC, GS and MS methods.

Formations of lipid bodies and peroxisomes in different strains were stained using fluorescent and electron microscopy methods (fluorescent microscopy: Olympus BX 51, program Photometrics CoolSNAP) Nile red (Sigma N3013), D3832 and D3922 (Mol. Probe) were used as fluorescent colors for lipid bodies visualization.

For peroxisome staining, anti-Aox3p primary antibody recognizing acyl-CoA oxidases in peroxisomes was developed in rabbit. ALEXA 488 and Texas Red Dye served as secondary fluorescent antibodies. Different strains were compared concerning to formation of lipid bodies and number of peroxisomes during the growth (certain time intervals).

For visual determination by scanning and transmission electron microscopy, yeast cells were fixed by glutaraldehyde and post-fixed by imidazole buffered osmium tetroxide. Oil droplets and specific transport structures – protrusions – were identified on the cell surface. Lipid bodies and peroxisomes were visible inside cells. Increasing size of lipid bodies correlated with biomass increase.

SYNTEZA A CHARAKTERIZACE POLYPYRROLOVÉHO FILMU NA PERFLUOROVANÉ SULFONOVANÉ MEMBRÁNĚ TYPU NAFION

SABINA MORAVCOVÁ a KAREL BOUZEK

Ústav anorganické technologie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Již více než dvě desetiletí jsou systematicky studovány látky se zpracovatelskými vlastnostmi polymerů a elektrickými vlastnostmi typickými pro polovodiče a kovy. Tyto látky jsou označovány jako vodivé polymery (CP). Jsou charakteristické tím, že na rozdíl od ostatních polymerů vykazují v oxidovaném stavu vysokou elektronovou vodivost. Do této skupiny látek patří např. polyacetylen, polythiofen, polyfenylen a z našeho hlediska nejzajímavější polyanilin (PAni) a polypyrrol (PPy). Posledně jmenovaným polymerem jsme se zabývali v rámci předkládané práce. Důvodem volby tohoto polymeru je jeho dobrá chemická a mechanická stabilita, vysoká elektronová vodivost a snadná elektrochemická syntéza kompaktních filmů z vodného roztoku monomeru.

Jednu z perspektivních aplikací CP představuje konstrukce nového typu elektrod pro nízkoteplotní palivový článek typu PEM (Proton Exchange Membrane). Zde CP slouží jako nosič katalyzátoru. Výhodou tohoto materiálu je schopnost vést paralelně elektrony i ionty. To zvyšuje pravděpodobnost vzniku tzv. trojfázového kontaktu nezbytného pro uskutečnění požadované elektrodové reakce a vede tak ke zvýšení stupně využití katalyzátoru. Další významný argument představuje fakt, že interakce částic platinového katalyzátoru s CP vede ke vzniku kompozitu, jehož odolnost proti katalytické otravě oxidem uhelnatým je vyšší než u klasického platinového katalyzátoru na uhlíkovém nosiči. Rovněž tento jev vede ke snížení množství katalyzátoru nezbytného k dosažení potřebného výkonu palivového článku a tím ke snížení jeho výrobní ceny.

Práce dosud publikované na toto téma v odborné literatuře se zabývají především problematikou charakterizace elektrokatalytické aktivity kompozitů připravených z různých materiálů a za použití různých způsobů modifikace CP filmu katalyzátorem. Z těchto studií však nevyplývá, zda a jakým způsobem lze připravit elektrokatalyticky aktivní tzv. Membrane-Electrode-Assembly (MEA), neboli vlastní palivový článek sestávající z elektrolytu ve formě funkcionalizované polymerní membrány s elektrodami připevněnými iontově vodivým kontaktem na jejích stranách. Klasické techniky lisování za horka, popř. naprašování katalyzátoru s nosičem nelze v tomto případě použít. Rovněž elektrochemická syntéza CP filmu přímo na povrchu membrány nepřipadá v úvahu, neboť tato membrána není elektronově vodivá. Cílem předkládané studie bylo připravit systém CP-PEM-CP, tedy anoda–elektrolyt–katoda a charakterizovat výsledné kompozity.

Jako PEM byla použita membrána Nafion 117, která představuje materiál dosud nejrozšířenější při výrobě tohoto typu palivového článku. Polypyrrolový film byl přímo na povrchu této membrány syntetizován chemicky s možností eventuálního elektrochemického dosyntetizování CP filmu požadova-

né tloušťky. Získané kompozity vykazují dobrou mechanickou stabilitu a elektrochemickou aktivitu. Charakterizovány byly jak pomocí klasických elektrochemických technik, tak s využitím elektronové mikroskopie, UV-VIS a FTIR spektroskopie. V rámci přednášky budou prezentovány získané údaje o struktuře kompozitu, kinetice růstu CP filmu na povrchu Nafionu, jeho elektrochemické aktivitě a možnostech modifikace platinovým katalyzátorem.

MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ SENSITIZACE NA ÚČINKY OPIOIDŮ U MYŠÍ A PRŮKAZ ZMĚN HLADIN m-RNA OPIOIDNÍCH RECEPTORŮ

**V. MORAVEC, M. VOTAVA, J. SLÍVA,
E. ŽDÁRSKÝ a M. KRŠIAK**

Ústav farmakologie, 3. Lékařská fakulta, Karlova univerzita, Ruská 87, 100 00 Praha 10

Cílem naší práce bylo zjistit, zdali nelze vznik behaviorální a neurochemické sensitizace k účinkům morfinu ovlivnit chronickým podáváním memantinu (1-amino-3,5-dimethyl-adamantanu), NMDA nekompetitivního antagonisty, a fluoxetinu (SSRI) v době mezi ukončením chronického podávání morfinu a podáním provokující dávky.

Myši (ICR kmen, Velaz, Praha) byly léčeny morfinem ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) s fluoxetinem ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) či memantinem (10 a $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$). Kontrolní skupiny byly léčeny fyziologickým roztokem (i.p.) či morfinem ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) po dobu 10 dnů $1 \times$ denně (den 1 až 10). Provokující dávka morfinu ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) byla podána den po ukončení léčby memantinem a fluoxetinem (21. den) či 15 dnů po ukončení této léčby (36. den). Pro průkaz behaviorální sensitizace byla sledována horizontální lokomoční aktivita (Ugo Basile Activity Cage 7531) 1 hodinu po aplikaci morfinu po dobu tří minut 1., 5., 10. a 20. den aplikace morfinu. A páté měření lokomoce 21. nebo 36. den po podání provokující dávky morfinu ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) či fyziologického roztoku skupinám kontrolním.

Po usmrcení (21. či 36. den) jsme provedli odběr mozkové tkáně v mezolimbické a prefrontální oblasti a izolovali celkové RNA. Pomocí RT-PCR v real time uspořádání (interkalační SYBRGreen varianta) jsme stanovovali změny genové exprese mRNA m a k opioidních receptorů.

Výsledky prokazují ovlivnění behaviorální sensitizace memantinem, kterým odpovídají i změny hladin m-RNA v mozku.

VZ: J13/98:111200005.

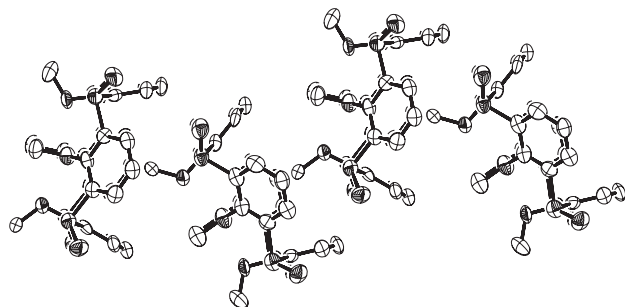
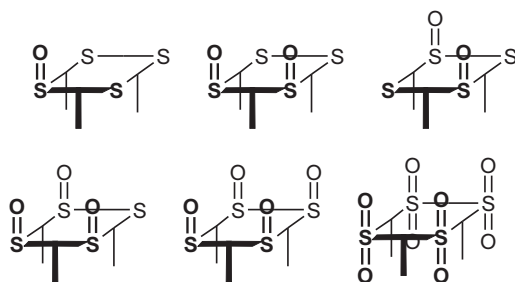
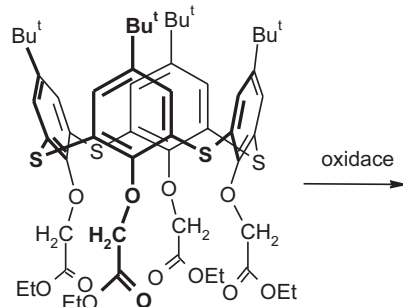
STEREOSELEKTIVNÍ A REGIOSELEKTIVNÍ OXIDACE THIALIX[4]ARENŮ

JIRÍ MORÁVEK^a, PAVEL LHOTÁK^a,
IVAN STIBOR^a a JAN SÝKORA^b

^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav chemických procesů, Akademie věd České republiky, Rozvojová 125, 165 02 Praha 6
e-mail: Jiri.Moravek@vscht.cz

Stereoselektivní a chemoselektivní oxidace můstkových atomů síry vede k zavedení sulfoxidových skupin na skelet thiacalix[4]arenu. Tato reakce bude demonstrována s využitím různě alkylovaných derivátů thiacalix[4]arenu (Me, Et, Pr, Benzyl, CH₂COOEt). Oxidace se provádí dusičnanem sodným v trifluoroctové kyselině za laboratorní teploty. Bude diskutována souvislost konformace výchozí látky se stereochemií vzniklého produktu.

Tetraacetát thiacalix[4]arenu v cone konformaci byl použit jako výchozí látka pro regio- a stereoselektivní oxidaci. Použitím různých oxidačních činidel byly připraveny odpo-



vídající sulfanyl (mono-, di-, tri-, tetra-) a tetrasulfonyl deriváty, které byly charakterizovány spektrálními metodami.

Některé nově připravené sloučeniny vykazují velmi zajímavé vlastnosti v pevném stavu. Rentgenová strukturní analýza 25,26,27,28-tetramethoxy-tetrasulfonylcalix[4]arenu ukazuje, že tato sloučenina vytváří nekonečné kanály, které drží pohromadě pomocí CH-p interakcí mezi methoxy skupinami a aromatickou kavitou sousední molekuly.

LITERATURA

1. Iki N., Kumagai H., Morohashi N., Ejima K., Hasegawa M., Miyanari S., Miyano S.: *Tetrahedron Lett.* 39, 7559 (1998).
2. Iki N., Narumi F., Fujimoto T., Morohashi N., Miyano S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1998, 2745.
3. Lhoták P.: *Tetrahedron* 57, 4775 (2001).

ISOLATION OF MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN FROM PLASMA OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA USING AFFINITY CHROMATOGRAPHY

R. MUSILOVÁ^{a,*}, E. TÁBORSKÁ^d, H. NOVOTNÁ^c,
L. BOURKOVÁ^a, L. KOVÁŘOVÁ^{a,b},
T. BÜCHLER^{a,b}, M. PENKA^a, and R. HÁJEK^{a,b}

^aLaboratory of Experimental Hematology and Immunotherapy, Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 639 00 Brno, ^bDepartment of Internal Medicine – Hematooncology, ^cDepartment of Clinical Biochemistry, University Hospital, Brno, ^dDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno
e-mail: 20287@mail.muni.cz

Multiple myeloma is characterized by the proliferation of a malignant plasma cell clone and accounts for approximately 10 % of hematological malignancies. High-dose chemotherapy with autologous transplantation has improved the survival of patients with myeloma, however, relapse is inevitable¹. Recent research has targeted the minimal residual disease. One of the therapeutic options in this setting is immunotherapy using specific tumor antigen as a vaccine. The idiotype of myeloma immunoglobulin (Id protein) that is specifically expressed by malignant cells can be used as a tumor antigen with the aim to induce cytotoxic T-lymphocyte response against myeloma cells^{2,3}.

For purification of Id protein, the plasma of relapsed IgG myeloma patients, who were before reinduction treatment, was precipitated with a saturated solution of ammonium sulphate. After precipitation and dialysis in saline at pH 7.3 to remove ammonium sulphate, the Id protein was separated on protein G immobilised on agarose. To breach the bound between the Id-protein and the protein G, 0.2 M glycine (pH 2.7) was used and resulting fractions were immediately neutralized in 1 M Tris-base. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was used to determine the purity of Id protein. The isolation was carried out from plasma of 10 patients. Columns with the capacity of 30 mg.ml⁻¹ protein G and the flow rate of 1–2 drops per 10 seconds were used. The yield of Id protein ranged from

22 to 89 % of the amount applied on the column. The amount of Id protein extracted in each isolation was sufficient to a prepare Id-KLH conjugate that was used as the specific antigen in preclinical experiments.

This project was supported by the Grants IGF FNB 4/99 and IGA MZČR 6763-3 and MZČR 000 65 26 97 05.

REFERENCES

1. Hájek R., Vášová I., Adam Z., Mayer J.: *Acta Med. Austriaca* 23, 91 (1996).
2. Kwak L. W., Taub D. D., Duffey P. L., Bensinger W. I., Bryant E. M. et al.: *Lancet* 345, 1016 (1995).
3. Österborg A., Yi Q., Henriksson L., Fagerberg J., Bergenbrant S.: *Blood* 91, 2459 (1998).

VYUŽITÍ STEREOLOGICKÝCH METOD PRO KVANTITATIVNÍ ANALÝZU ATEROSKLEROTICKÝCH LÉZÍ VE STĚNĚ CÉVY U EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU KRÁLÍKA

P. NACHTIGAL^a, V. SEMECKÝ^a, M. KOPECKÝ^a, A. GOJOVÁ^a, D. SOLICHOVÁ^b a P. ŽDÁNSKÝ^b

^aKatedra lékařských a biologických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ^bKlinika gerontologická a metabolická, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze

Ateroskleróza je chronické systémové zánětlivé onemocnění, charakterizované endoteliální dysfunkcí s následnou kumulací lipidů, leukocytů, hladkosvalových elementů a extracelulární matrix v intimě cév, což má za následek zužování cévního lumen s následnou redukcí až obstrukcí cévního průtoku. Morfometrická kvantifikace aterogenních změn je dnes často používána k objektivnímu popisu aterosklerotických lézí u experimentálních zvířat i lidí. Stereologie zahrnuje soubor metod, které se používají ke kvantifikaci dvojrozměrných a trojrozměrných struktur pomocí řezů, či projekcí. Stereologické metody je mimo jiné možno využít pro odhady celkového objemu objektu, plochy povrchu objektu, délky lineárních útvarů a počtu částic.

Jako experimentální model byl v této práci zvolen králík kmene Novozélandský bílý. K indukci aterogenních změn byla použita standardní dieta obohacená o 0,4 % cholesterolu, která byla podávána zvířatům po různé dlouhou dobu (1–3 měsíce). K detekci makrofágů, hladkosvalových buněk a adhezivních molekul VCAM-1, ICAM-1 byly použity imunohistochemické metody. Pomocí stereologických metod bylo poté hodnoceno několik parametrů, které charakterizují aterogenní proces. Patří mezi ně objem aterosklerotických lézí, procentuální zastoupení makrofágů a hladkosvalových buněk v lézi a celková plocha exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně cévy (intima a medie).

Biochemické vyšetření potvrdilo indukci hypercholesterolemie u experimentální skupiny zvířat. Stereologický odhad objemu aterosklerotické léze pomocí Cavalieriho metody prokázal zvyšování objemu v závislosti na délce aterogenní diety. Imunohistochemické metody potvrdily detekci makrofágů

a hladkosvalových buněk VCAM-1 a ICAM-1 v intimě cév pouze u experimentální skupiny zvířat. Stereologická analýza prokázala větší procentuální zastoupení makrofágů v lézi vůči hladkosvalovým buňkám. Dále bylo prokázáno, že exprese VCAM-1 a ICAM-1 roste v závislosti na délce diety a že je lokalizována především v oblasti aterosklerotického plátu.

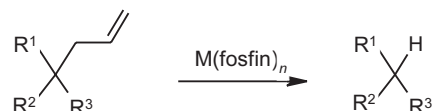
Výsledky biochemické, imunohistochemické a stereologické analýzy dle očekávání potvrdily indukci aterogenních změn u jedinců, kterým byla podávána dieta s obsahem 0,4 % cholesterolu. Práce ale především poukázala na výhodnost použití stereologických metod pro kvantifikaci velikosti aterosklerotických lézí a pro kvantifikaci imunohistochemických barvení. V současnosti probíhá studie, která využívá výše uvedených metod ke sledování vlivu vybraných farmak ze skupiny statinů na aterogenní procesy ve stěně cévy.

ŠTĚPENÍ γ,δ -C-C VAZBY TERMINÁLNÍCH ALKENŮ

DAVID NEČAS a MARTIN KOTORA

Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Hlavova 6, 128 43 Praha 2
e-mail: david.necas@seznam.cz

Reakcí alkenů s komplexy různých přechodných kovů dochází většinou k tvorbě vazeb C–kov, které pak reagují dále za vzniku jedné či více nových C–C vazeb. Typickým příkladem jsou např. cyklizace dienů¹, polymerace² atd. Opačný proces, tj. degradace alkenů na menší celky, není příliš znám. Tento jev totiž vyžaduje, aby při reakci docházelo k aktivaci a štěpení C–C vazeb. Štěpení C–C vazeb pomocí komplexů přechodných kovů je sice známá reakce, ale probíhá většinou pouze s látkami se silným sterickým pnutím, kde je hnací silou snížení tohoto pnutí. Štěpení alicyklických olefinů je spíše chemická rarita³.



Tato práce vychází z předešlého studia cyklizací 2-chlor- α,ω -dienů, při které jsme zjistili, že volbou vhodně substituovaných alkenů a za určitých podmínek nedochází k cyklizaci na deriváty cyklopentanu (tvorba nové C–C vazby), ale ke štěpení γ,δ -vazby výchozího dienu. Výsledná látka přitom ztratila tříuhlíkatý fragment a proto formálně došlo k dealylaci. Tento jev byl podroben zkoumání na dalších vhodně substituovaných terminálních alkenech za použití komplexů různých přechodných kovů. V příspěvku bude diskutován vliv přechodného kovu a substituce ve výchozích látkách na průběh reakce, pravděpodobný reakční mechanismus a potenciální syntetické využití.

LITERATURA

1. (a) Knight K. S., Waymouth R. M.: *J. Am. Chem. Soc.*

- 113, 6268 (1991); (b) Yamamoto Y., Ohkoshi N., Kamada M., Itoh K.: J. Org. Chem. 64, 2178 (1999).
 2. Chen E. Y. X., Marks T.: J. Chem. Rew. 100, 1391 (2000).
 3. Yamazaki T., Kasatkin A., Kawanaka Y., Sato F.: J. Org. Chem. 61, 2266 (1996).

STANOVENÍ CYTOKININŮ V ROSTLINÁCH METODOU IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE A KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

**ONDŘEJ NOVÁK, PETR TARKOWSKI,
DANUŠE TARKOWSKÁ, KAREL DOLEŽAL,
RENÉ LENOBEL a MIROSLAV STRNAD**

*Laboratoř růstových regulátorů, Palackého univerzita a Ústav
experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc*

Pro stanovení většiny přirozeně se vyskytujících isoprenoidních a aromatických cytokininů v rostlinách jsme vyvinuli novou citlivou metodu. Jejím základem je kvalitní chromatografická separace 20 rostlinných hormonů – cytokininů (báze, ribosidy a 9-glukosidy) na reverzní fázi ve spojení s hmotnostní detekcí na jednoduchém kvadrupólu (HPLC/MS), za podmínek ionizace elektrosprejem. Pro stanovení *O*-glukosidů a nukleotidů cytokininů lze tuto metodu rovněž s úspěchem použít po předchozím enzymovém ošetření rostlinných extraktů.

Tok mobilní fáze byl dělen za chromatografickou kolonou v poměru 1:1 a současně měřen na detektoru diodového pole a hmotnostním detektoru. Pro stanovení cytokininů byly hledány vhodné podmínky – optimální průtok mobilní fáze, desolvační teplota, průtok desolvačního plynu, nejvhodnější napětí na kapiláře elektrospreje a optimální napětí na vstupní šterbině hmotnostního detektoru pro účinnou ionizaci analytů v iontovém zdroji. Sledované cytokininy byly monitorovány na hlavním molekulovém píku [M+H]⁺ při použití nízkého napětí na vstupní šterbině (20 V) v režimu sledování vybraného iontu, tzv. selektivní iontový monitoring (SIM). Při splnění těchto podmínek jsme dosáhli limit detekce v rozmezí 10–50 fmol.

Pro běžnou laboratorní praxi byl ověřen optimální lineární rozsah kalibrace 25(75) fmol–100 pmol při kvantifikaci přirozeně se vyskytujících isoprenoidních a aromatických cytokininů v přečištěných extraktech tabákových kultur BY-2 a v topolových listech (*Populus × Canadensis* Moench, cv *Robusta*).

Spolehlivost metody byla validována za pomoci směsi deuterovaných cytokininových standardů přidávaných při extrakci rostlinného materiálu. Rostlinný materiál byl po extrakci do Bieleeského roztoku přečištěn použitím dvojnásobné ionexové chromatografie (SCX a DEAE Sephadexu) v kombinaci s imunoafinitní chromatografií na gelu s navázanými skupinovými selektivními monoklonálními protilátkami proti cytokininům. Přítomnost isoprenoidních a aromatických cytokininů ve studovaných extraktech byla současně potvrzena metodou enzymatické imunoanalýzy (ELISA), které předcházela rovněž chromatografická separace pomocí HPLC.

VYUŽITÍ NÁDOROVÝCH VAKCÍN U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

D. OČADLÍKOVÁ

*Laboratoř léčebné a experimentální hematologie a buněčné
imunoterapie (LEHABI), Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 635 00 Brno*

e-mail: docadlikova@fnbrno.cz

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou proliferací plazmatických buněk (B-lymfocytů), produkujících monoklonální imunoglobulin (Id-protein-možnost izolace z plazmy MM-pacienta). MM zaujímá asi 10 % ze všech hematologických nádorových onemocnění a medián dlouhodobého přežití je asi 3–5 let v případě, jsou-li nemocní léčeni pomocí chemoterapie či chemoterapie a autologní transplantace. MM je tedy smrtelné onemocnění.

Dendritické buňky (DB) jsou profesionální antigen-prezentující buňky známé svou schopností účinně předkládat antigeny (Ag) T-lymfocytům a indukovat takto protinádorovou odpověď specifických cytotoxických T-lymfocytů (CTL) *in vivo*. Doposud byly připraveny vakcíny, kde jako nádorové Ag sloužily lyzáty myelomových buněk, Id-protein, DB a Id-proteinem (či jinými Ag – nikoli však na našem pracovišti) stimulované DB. Tyto vakcíny jsou netoxické.

Největší protinádorová odpověď byla vyvinuta při podání antigenem (na našem pracovišti Id-proteinem) stimulovaných DB. Avšak tato odpověď byla jen mírná, což svědčí o limitované imunogenitě Id-proteinu. Proto jsou navrhovány jiné postupy vpravení nádorového Ag do DB za účelem indukce tumor-specifických CTL, které se ubírají dvěma směry 1) použitím univerzálnějšího nádorového Ag než je Id-protein (TAA-tumor asociované Ag) 2) elektroporace celkové tumorové mRNA do DB.

Jako univerzální nádorové Ag u MM je možno využít například katalytickou podjednotku telomerasy (hTERT) exprimovanou na povrchu MM-buněk. Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích eukaryotických chromozomů, které stabilizují a chrání. Telomerasa je ribonukleový enzym syntetizující telomery reverzní transkripcí (hTERT) její templátové RNA. U zdravých buněk je telomerasová aktivita reprimována a tudíž jejich replikační kapacita omezena. U nádorových buněk je vysoká a je podmínkou jejich nesmrtnosti, malignity. Telomerasová aktivita byla detegována u 90 % všech lidských nádorů. Je prokázáno, že hTERT je schopna indukovat CTL namířené proti MM-buňkám.

Dalším dobrým kandidátem na tumorový antigen je MUC1, epitheliální membránový glykoprotein, který je rovněž exprimován MM-buňkami. Slouží jako tumorový marker a byl detegován v séru MM-pacientů. Imunizace nádorovými peptidy je však limitována počtem Ag a HLA-typem pacienta. Proto se do popředí zájmu dostává elektroporace (vpravení pomocí krátkého elektrického šoku) celkové tumorové mRNA do DB. Nevyžaduje definici TAA a HLA-typu a je možno ji amplifikovat pomocí RT-PCR. Dále je její účinnost srovnatelná s virovou transdukcí bez rizik virového přenosu.

Doufáme, že některé z těchto nově navrhovaných a zkoušených postupů přinese výsledky v léčbě pacientů s mnohočetným myelomem.

VÝZNAM LIDSKÉ ASPARTYL (ASPARAGINYL) β -HYDROXYLASY PŘI MALIGNÍCH TRANSFORMACÍCH, JEJICH DIAGNOSTICE A LÉČBĚ

EVA OTÁHALOVÁ^a, MICHAEL S. LEBOWITZ^b
a HOSSEIN A. GHANBARI^b

^aÚstav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2, ^bPanacea Pharmaceuticals, 207 Perry Parkway, Suite 2, Gaithersburg, MD 20877, USA

Lidská aspartyl (asparaginy) β -hydroxylasa (HAAH) je enzym katalyzující posttranslační modifikace specifických domén signálních proteinů, receptorů, proteinů spojených s transformací a enzymů, které se účastní apoptosy. Jedná se o transmembránový enzym vyskytující se na membráně endoplazmatického retikula buněk všech testovaných tkání.

Zvýšená produkce i aktivita HAAH byly pozorovány v buňkách různých druhů pevných maligních nádorů. U těchto buněk, na rozdíl od buněk normálních, se HAAH vyskytuje ve velké míře i na cytoplazmatické membráně. Hydroxylasová aktivita HAAH je u maligních buněk zvýšena asi 10 $\times$ (cit.¹). Bylo prokázáno, že nadprodukce HAAH je dostatečná k indukci buněčné transformace, zvyšuje pohyblivost a schopnost buněk invaze do dalších tkání, která je spojena s tvorbou metastáz, a vede ke vzniku nádorů *in vivo*².

Imunohistochemicky jsme testovali biopsie 12-ti různých typů solidních nádorů ($n > 1000$) a také vzorky příslušných zdravých tkání ($n > 200$). Pomocí dvou specifických monoklonálních protilátek byl HAAH detegován u 99 % vzorků maligních nádorů, ne však u vzorků příslušných zdravých tkání. Imunochemicky (ELISA, Western blotting) byl HAAH detegován v živném mediu a také vzorcích séra pacientů s maligní transformací. Ošetření linií nádorových buněk monoklonálními protilátkami *in vitro* vedlo k omezení projevů malignity buněk – intenzivního buněčného růstu a dělení, schopnosti pohybu a průniku buněk do dalších tkání.

Zjištěné vlastnosti HAAH a příslušných specifických protilátek naznačují možnost využití při diagnostice maligních transformací neinvazivní cestou vyšetřením tělních tekutin. Kromě velmi citlivé diagnostiky mohou být specifické protilátky použity též k léčbě maligních transformací a to využitím jejich schopnosti potlačit maligní vlastnosti a projevy transformovaných buněk, nebo jejich použitím pro cílený transport cytostatik.

LITERATURA

1. Lavaissiere L., Jia S., Nishiyama M., de la Monte S., Stern A. M., Wands J. R., Friedman P. A.: J. Clin. Investig. 98, 1313 (1996).
2. Ince N., de la Monte S., Wands J. R.: Cancer Res. 60, 1261 (2000).

ENZYMY KVASINKY *Candida tropicalis* PARTICIPUJÍCÍ NA BIODEGRADACI FENOLU

JAN PÁČA a MARIE STIBOROVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Albertov 230, 128 40 Praha 2

Řada složek životního prostředí je kontaminována fenolickými látkami. Kvasinky *Candida tropicalis* jsou schopné využívat fenolu jako zdroje uhlíku a energie. Hydroxylace fenolu na katechol je prvním, limitujícím krokem aerobní degradace fenolu. Následné přeměny tohoto produktu katalyzují enzymy štěpící aromatické dihydroxyderiváty. Katechol-1,2-dioxygenasa zprostředkuje vznik kyseliny *cis,cis*-mukonové, která se metabolizuje na acetyl CoA a sukcinát. Katechol-2,3-dioxygenasa participuje na tvorbě semialdehydu kyseliny 2-hydroxymukonové, z které se dále tvoří pyruvát. Výsledné produkty vstupují do intermediárního metabolismu buňky. V práci je řešena lokalizace, charakterizace a izolace enzymových systémů kvasinky *C. tropicalis* degradujících fenol. To je důležité z hlediska genového inženýrství (navržení rekombinantních kmenů využitelných v biotechnologiích a bioremediacích). Z kvasinek *C. tropicalis*, rostoucích ve třech různých mediích v přítomnosti glukózy, fenolu nebo obou těchto zdrojů uhlíku, byly izolovány subcelulární kompartmenty, mikrosomy a cytosol. V obou frakcích byla sledována aktivita enzymů schopných oxidovat fenol. Zatímco žádná aktivita nebyla detegována v mikrosomech a cytosolu buněk rostoucích na glukóze, buněčné kompartmenty *C. tropicalis*, rostoucí v mediu obsahujícím fenol, vykazovaly fenolhydroxylasovou aktivitu. V mikrosomech byla zaznamenána indukce hlavních složek monoxygenasového systému se smíšenou funkcí, cytochromu P450 (CYP) a NADPH:CYP reduktasy, schopných hydroxylovat fenol. Stejně tak i v cytosolu došlo působením fenolu k indukci flavoproteinové monoxygenasy, NADPH-dependentní fenolhydroxylasy. S využitím originálně vyvinuté metody HPLC a pomocí hmotnostních analýz bylo zjištěno, že fenol je monoxygenasami *C. tropicalis* oxidován na katechol. V práci porovnáujeme účinnost hydroxylačních enzymů obou buněčných kompartmentů.

Autoři děkují za podporu MŠMT ČR (MSM113100001) a GA ČR (104/03/0407).

MICROARRAYS – MODIFIKACE SKLENĚNÉHO POVRCHU PRO VAZBU BIOMOLEKUL

ONDŘEJ PAČES^a a WILHELM ANSORGE^b

^aÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^bEuropean Molecular Biology Laboratory, Mayerhofstr. 1, D-69117 Heidelberg, Germany
e-mail: paces@uochb.cas.cz

Primární výhodou microarrays^{1,2} technologie je možnost studia interakcí velkého souboru látek v jediném experimentu. Metoda byla vystavěna na základě výzkumu interakcí DNA. Princip spočívá ve vysokohustotním umístění a navázání vzor-

ků DNA (primery, geny či známé sekvence) na podložní materiál. Tím vzniká tzv. microarray (též chip, slide). Vzniklé pole DNA se následně hybridizuje se substrátem, kterým může být např. směs značených úseků DNA z biologického materiálu. Scanováním povrchu pole se pak získá přehled o interakcích vázané DNA na povrchu chipu se značenou DNA.

V poslední době se metoda rozšiřuje i na průzkum interakcí dalších typů molekul (zejména proteinů)^{3,4} a dokonce i celých buněk⁵. To přináší celou řadu problémů. Na rozdíl od jasných a velmi specifických interakcí DNA je působení mezi jinými typy biomolekul méně uniformní.

V současné době se používají dva druhy vázání molekul k podložnímu substrátu⁶. Jedná se buď o vytvoření kovalentní vazby nebo o tvorbu většího počtu slabších elektrostatických interakcí.

Při studiu interakcí proteinů a podobných typů molekul se může objevit problém sterického bránění interagujícího místa v případě, že dochází k vazbě na substrát právě v této oblasti. Proto byla prováděna studie vlastností různých druhů povrchů vhodných k vazbě s cílem vyhnout se výše zmíněnému efektu.

Předmětem mého výzkumu byl způsob vazby biomolekul na skleněný substrát. Ukázalo se totiž, že to je jedna z klíčových věcí v chipové technologii.

Byla vyvinuta metoda modifikace skleněných povrchů alkylaminořetězcí pro DNA chipy. Pro povrchy proteinových chipů byly objeveny nové metody modifikace skla, které zabraňují diskutovaným problémům.

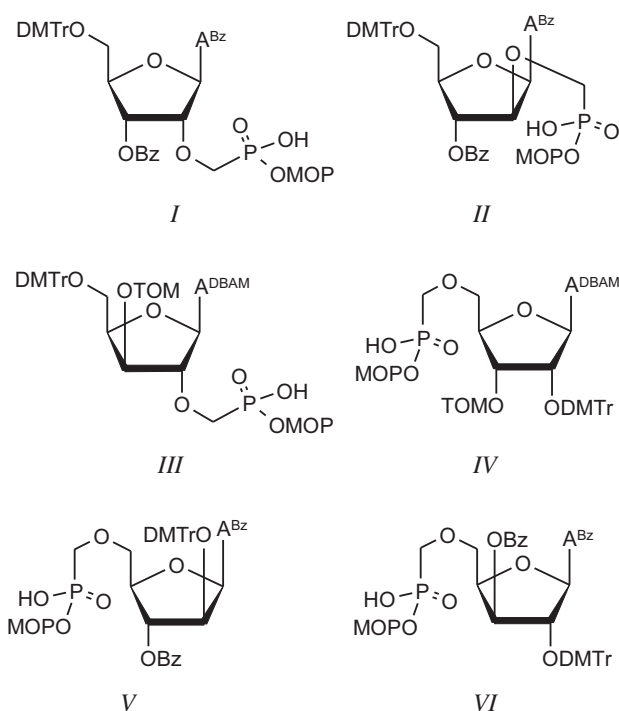


Schéma 1

LITERATURA

1. Lehrach H., Drmanac R., Hoheisel J. D., Larin Z., Lennon G., Monaco A. P., Nizetic D., Zehetner G., Poustka A., v: *Genome Analysis: Genetic and Physical Mapping* (Davies K. E., Tilghman S., ed.), str. 39. Gold Spring Laboratory Press, Gold Spring Harbor, NY 1990.
2. Lennon G., Lehrach H.: *Trends Genet.* 7, 314 (1991).
3. MacBeath G., Schreiber S. L.: *Science* 289, 1760 (2000).
4. Haab B. B., Dunham M. J., Brown O. P.: *Genome Biol.* 1 (6), preprint0001.1-0001.22 (2000).
5. Ziauddin J., Sabatini D. M.: *Nature* 411, 107 (2001).
6. Beier M., Hoheisel J. D.: *Nucl. Acides Res.* 27, 1970 (1999).

2'-5' OLIGOADENYLÁTY S C-FOSFONÁTOVOU INTERNUKLEOTIDOVOU VAZBOU

**ONDŘEJ PÁV, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ,
MILENA MASOJÍDKOVÁ a IVAN ROSENBERG**

*Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: pav@uochb.cas.cz*

V posledních letech bylo vynaloženo značné úsilí při hledání modifikovaných oligonukleotidů, potenciálních antisenzních terapeutik, které by vykazovaly zlepšené hybridizační vlastnosti, zvýšenou stabilitu vůči nukleasám a vysokou rozpoznávací specifitu vůči cílové RNA. Nahrazení fosfodiesterové vazby alternativní anionickou, neutrální nebo kationickou internukleotidovou vazbou je jednou z možností, jak ovlivnit právě tyto požadované vlastnosti.

V rámci našeho studia fosfonátových analogů nukleotidů a oligonukleotidů¹⁻⁴ byly připraveny vhodně chráněné monomery (schéma 1) pro syntézu oligonukleotidů fosfotriesterovou metodou získané z příslušných ribo, xylo a arabino nukleosidů. Metodika chránění adeninových nukleosidů byla vypracována tak, aby bylo možné syntetizovat plně chráněné fosfonáty jak v 2' tak v 5' řadě.

Z těchto monomerů byly připraveny oligoadenylátové *n*-mery, u nichž byla testována stabilita vůči různým typům nukleas a také jejich hybridizační vlastnosti. Zavedení C-fosfonátové vazby, která je neisosterní a isopolární vzhledem k fosfodiesterové, vede ke vzniku dvou regioisomerních internukleotidových vazeb (2'-O-CH₂-P-O-5'' a 2'-O-P-CH₂-O-5''), které se liší enzymatickou stabilitou i hybridizačními vlastnostmi.

Práce je podpořena grantem reg. č. A4055101 AV ČR v rámci výzkumného projektu Z4055905.

LITERATURA

1. Králíková Š., Buděšínský M., Masojídková M., Rosenberg I.: *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids* 19, 1159 (2000).
2. Králíková Š., Buděšínský M., Masojídková M., Rosenberg I.: *Tetrahedron Lett.* 41, 955 (2000).
3. Rejman D., Snášel J., Liboska R., Točík Z., Pačes O., Králíková Š., Rinnová M., Koiš P., Rosenberg I.: *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids* 20, 819 (2001).
4. Hanuš J., Barvík I., Ruzzová-Chmelová K., Štěpánek J., Turpin P. Y., Bok J., Rosenberg I., Petrová-Endová M.: *Nucl. Acides Res.* 29, 5182 (2001).

NEW MYCOBACTERIAL HALOALKANE DEHALOGENASE DhmA: CLONING, EXPRESSION AND IDENTIFICATION OF A CATALYTIC TRIAD

M. PAVLOVÁ^a, A. JESENSKÁ^a, Y. NAGATA^b,
and J. DAMBORSKÝ^a

^aNational Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bDepartment of Environmental Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai, 980-8577, Japan

Haloalkane dehalogenases are enzymes that belong to the α/β -hydrolase superfamily. They are bacterial enzymes cleaving the carbon-halogen bond of the halogenated aliphatic compounds by a hydrolytic mechanism. These enzymes have a potential application in detoxification of subsurface pollutants and recovery of industrial side products. Four different haloalkane dehalogenases have been described in the literature until today: Dh1A enzyme from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ref.¹, DhA enzyme from *Rhodococcus* sp.²⁻⁵ and *Pseudomonas pavonaceae* 170 ref.⁶, LinB enzyme from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 ref.⁷ and DhmA enzyme from *Mycobacterium avium* N85 ref.⁸ DhmA has a broad substrate specificity and good activity with the priority pollutant 1,2-dichloroethane⁸ and it is the first dehalogenase obtained from bacterium that colonizes animal tissues. Therefore, we focused on DhmA in this project.

The tertiary structure of DhmA has not been determined yet, but it was predicted on its similarity to haloalkane dehalogenases by homology modeling. DhmA is expected to contain a main and a cap domain and it structurally belongs to the superfamily of α/β -hydrolases. This superfamily has a highly conserved arrangement of their catalytic residues: nucleophile-histidine-acid. The proposed residues of DhmA corresponding to the catalytic triad are Asp123, His279 and Asp250. Another catalytically important residue is W124 that play a role of halide-stabilizing amino acid. In order to confirm the catalytic residues of DhmA, we constructed four mutants by site-directed mutagenesis (D123A, W124L, D250A and H279A).

DhmA overexpressed in *Escherichia coli* GI724 showed low expression and low stability⁸. Therefore, we used pET-32(a) vector for improved expression of DhmA in current study. The pET-32(a) vector is designed for cloning and high-level expression of polypeptide sequences fused with thioredoxin protein. To support correct folding and stability of DhmA we used pG-Tf3 plasmid harboring trigger factor and GroEL-GroES chaperones. The trigger factor and GroEL-GroES chaperones play cooperative roles in assistance to folding for some proteins. Their overexpression can effectively prevent aggregation of recombinant proteins coexpressed in *E. coli*. Haloalkane dehalogenase DhmA was highly expressed and showed good activity in this expression system. All mutant proteins were inactive in crude extracts confirming essential role of the catalytic residues. Based on this result, detailed reaction mechanism of DhmA was proposed.

REFERENCES

1. Keuning S., Janssen D. B., Witholt B.: J. Bacteriol. 163, 635 (1985).
2. Yokota T., Omori T., Kodama T.: J. Bacteriol. 169, 4049 (1987).
3. Scholtz R., Leisinger T., Suter F., Cook A. M.: J. Bacteriol. 169, 5016 (1987).
4. Janssen D. B., Gerritse J., Brackman J., Kalk C., Jager D., Witholt B.: Eur. J. Biochem. 171, 67 (1988).
5. Sallis P. J., Armfield S. J., Bull A. T., Hardman D. J.: J. Gen. Microbiol. 136, 115 (1990).
6. Poelarends G. J., Wilkens M., Larkin M. J., vanElsas J. D., Janssen D. B.: Appl. Environ. Microbiol. 64, 2931 (1998).
7. Nagata Y., Miyauchi K., Damborsky J., Manova K., Ansorgova A., Takagi M.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 3707 (1997).
8. Jesenska A., Bartos M., Czernekova V., Rychlik I., Pavlik I., Damborsky J.: Appl. Environ. Microbiol. 68, 3724 (2002).

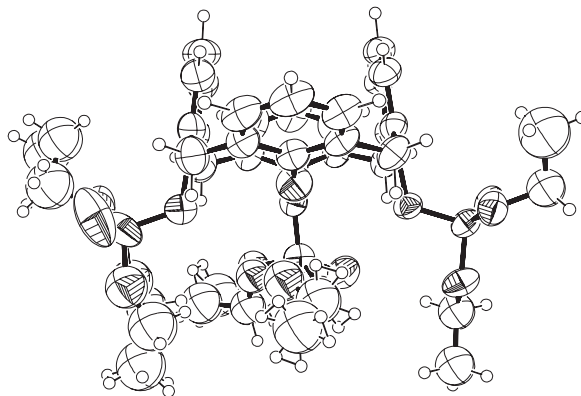
STRUKTURNÍ STUDIUM TRISUBSTITUOVANÝCH CALIX[4]ARENŮ

HANA PETŘÍČKOVÁ^a a JAN BUDKA^b

^aÚstav chemie pevných látek a ^bÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: hana.petrickova@vscht.cz, jan.budka@vscht.cz

K odstranění hydroxylových skupin ze spodního okraje calix[4]arenu se využívá redukce¹ příslušného tetrafosforyl-derivátu kovovým draslíkem v kapalném amoniaku. Při syntéze této sloučeniny reakcí calix[4]aren-25,26,27,28-tetraolu s diethyl-chlorfosfátem v přítomnosti K_2CO_3 v acetonu byl získán trisubstituovaný derivát 26,27,28-tris(diethoxy-fosforyloxy)calix[4]aren-25-ol. Produkt byl odpařen do sucha (žlutý olej) a ponechán bez rozpouštědla krystalovat. Pomocí rentgenové strukturní analýzy na monokrystalu byla určena molekulová a krystalová struktura tohoto „trifosfátu“ calix[4]arenu (obr. 1).



Obr. 1.

Získaná struktura je v mnoha pohledech unikátní. Rešerší v Cambridgeské strukturní databázi bylo zjištěno, že všechny rentgenové struktury trisubstituovaných calixarenů²⁻⁴ ve stlačené kónické konformaci mají dvě protější jádra koplánární, zatímco u našeho derivátu jsou jádra stlačena horními okraji k sobě. Také poloha vodíku hydroxylové skupiny se svou orientací zcela vymyká pravidlům. U monosubstituovaných, disubstituovaných a trisubstituovaných calix[4]arenů jsou hydroxylové skupiny většinou vázány vodíkovými vazbami k vedlejším etherickým kyslíkům. V případě studovaného trisubstituovaného calix[4]arenu jsou etherické kyslíky vedlejších jader hydroxyly více vzdálené a OH skupina je zcela unikátním způsobem orientována dovnitř kavity. Z naměřených vzdáleností lze předpokládat, že vodík hydroxylové skupiny je v kavitě poután neobvyklou O-H- π interakcí a zároveň slabou vodíkovou vazbu na protější etherický kyslík.

LITERATURA

1. McMurphy J. E., Phelan J. C.: *Tetrahedron Lett.* 32, 5655 (1991).
2. König B., Fricke T., Dix I., Jones P. G., Thondorf I.: *Liebigs Ann. Chem.* 1997, 2315.
3. Gloede J., Keitel I., Costisella B., Kunath A., Schneider M.: *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* 117, 67 1996.
4. Markovsky L. N., Visotsky M. A., Pirozhenko V. V., Kalchenko V. I., Lipkowski J., Simonov Y. A.: *Chem. Commun.* 1996, 69.

MECHANISM OF ALA-PDT CYTOTOXIC EFFECTS ON K562 CELLS DERIVED FROM CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA

**M. PLUSKALOVÁ^a, P. HALADA^b,
K. SMETANA^a, and Z. HRKAL^a**

^a*Department of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague,* ^b*Laboratory of Mass Spectrometry, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*

Chronic myelogenous leukemia (CML) is known to be resistant to various chemotherapeutic treatments. An explanation of such a strongly and widely spread resistance on the molecular level is of a high importance.

The induction of an apoptotic process leading to a cell death is used for medical application in a treatment of leukemia in general. We used a cell line K562 as a model of blast phase of CML. A photodynamic treatment, ALA-PDT, was used as an inducer of apoptosis in different cell lines – HL60, HeLa etc. and is employed to treat a variety of cancers. ALA-PDT is based on the application of 5-aminolevulinic acid i.e. incubation of cells with 5-ALA followed by their irradiation with visible light. ALA-PDT represents a possible method for investigation of molecular processes within a treatment of CML.

The cell proliferation of K562 was found to be affected by photodynamic treatment – ALA-PDT. The effect of light dose on proliferation of K562 preincubated with 1mM ALA for 4

hours was significant. It was determined by ³H-thymidine incorporation into the cell DNA within 18-hours. Light dose 12 J.cm⁻² reduced the number of proliferating cells by 50 %. Nevertheless, no apoptotic cells occurred. No apoptotic peak was obtained with propidium iodide assay using flow cytometry. The cytological findings showed the occurrence of necrosis rather than a presence of apoptotic cells within few hours after ALA-PDT.

But, interestingly, some pre-apoptotic events were reported. Stress-induced release of cytochrome c regulates caspase activity via Apaf-1 and activates an execution phase of apoptosis. The protein Bcl-XL prevents a release of cytochrome c from mitochondria after stress stimuli. The expression of anti-apoptotic protein Bcl-XL was down-regulated after ALA-PDT. Cytochrome c was found in cytoplasm in accordance with the down-regulation of Bcl-XL after ALA-PDT treatment. But on the contrary no caspase activity after ALA-PDT was detected.

Some other proteins which are connected to an apoptotic process weren't affected after ALA-PDT treatment at all. An expression of heat shock protein 60 remained at the same protein level. Phosphorylation of retinoblastoma protein, which is the key regulatory protein of cell cycle and apoptosis, wasn't changed in response to ALA-PDT.

It's possible to conclude, that ALA-PDT affects cell proliferation and enables an induction of some pre-apoptotic events which are subsequently somehow inhibited. Our preliminary results have shown, that some changes in protein phosphorylation or dephosphorylation on tyrosine occur after ALA-PDT. The identification of these proteins may contribute to explain reasons for inhibition of apoptotic processes, which were probably once induced.

This work was supported by grant GA CR 303/01/1445.

ENHANCEMENT OF DNA VACCINE POTENCY VIA MHC- AND/OR RECEPTOR-MEDIATED TARGETING SIGNALS

**D. POKORNÝ^a, M. ŠMAHEL^a, N. ČEŘOVSKÁ^b,
T. MORAVEC^b, H. SYNKOVÁ^b,
and J. VELEMINSKÝ^b**

^a*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, U Nemocnice 1, 128 00 Prague 2,*

^b*Institute of Experimental Botany of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6
e-mail: danap@uhkt.cz*

Vaccine strategies for treatment of human papillomavirus-induced cervical cancer are based mainly on the model antigen, human papillomavirus type 16 (HPV16) E7. The immunogenicity of E7 gene has been enhanced by construction of fusion genes, e.g. Sig/E7/LAMP-1 chimera¹. The sorting signal of the lysosome-associated membrane protein (LAMP-1) targets E7 into the endosomal and lysosomal compartments resulting in the enhanced presentation of the E7 antigen by MHC class II molecules. To increase safety of this fusion gene we introduced three point mutations into the pRb-binding site of E7. The immunogenicity of DNA vaccine with the resultant

Sig/E7GGG/LAMP-1 gene was found to be similar to Sig/E7/LAMP-1. We also fused the E7 and E7GGG antigens with mouse heat shock protein (HSP). The E7/HSP and E7GGG/HSP fusion genes generated higher E7-specific immune responses than E7, E7GGG, and HSP 70 genes in immunized mice. Another fusion gene L2/CP/E7, that contains common neutralization epitope of minor capsid protein L2 of HPV 16 fused with the coat protein (CP) of potato virus A (PVA) and with the HPV16 E7 epitope, showed enhanced immunogenicity in comparison with E7 and CP/E7. We hypothesized that this was caused by the L2 epitope, that bound to the unknown cell surface receptor². CP fusion proteins, just like CP alone, spontaneously assembled into virus-like particles (VLPs). The immunogenic efficacy of DNA vaccines was evaluated using two HPV16 transformed cell lines with different level of MHC class I surface expression: TC-1 cell line prepared by³ that has been MHC class I positive and its derivative, TC-1/A9 clone, with reduced surface production of MHC class I molecules, that has been developed in our laboratory. The loss of MHC class I expression has been accompanied by increased resistance of TC-1/A9 cells to DNA vaccination against the E7 antigen⁴. Mice were immunized i.d. by gene gun with 1 µg of each plasmid. In both the preventive immunization experiment (immunization/challenge) and the therapeutic immunization experiment (tumor cell inoculation/immunization) the incidence and growth of TC-1-induced tumors was highly reduced in mice treated with L2/CP/E7, and to the lesser extent in mice treated with E7/HSP, E7GGG/HSP and Sig/E7GGG/LAMP-1. In the preventive vaccination experiment, any protection against TC-1/A9-induced tumors was not achieved by immunization with E7/HSP, E7GGG/HSP nor Sig/E7GGG/LAMP-1. The data suggest that the fusions of HSP or L2 neutralization epitope with antigen are two promising strategies for the enhancement of vaccine potency.

REFERENCES

1. Wu et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11671 (1995).
2. Kawana et al.: J. Virol. 75, 2331 (2001).
3. Lin et al.: Cancer Res. 56, 21 (1996).
4. Šmahel et al.: Vaccine 21, 1125 (2003).

NOVÉ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ PŘÍSTUPY V PROTINÁDOROVÉ TERAPII

ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoto-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Vznik nádorů je zpravidla charakterizován mnohočetnými genetickými změnami, které ovlivňují především mechanismy kontrolující buněčnou proliferaci, diferenciaci a programovanou smrt buněk – apoptózu. Mezi nejčastější příčiny maligní transformace buňky patří inaktivace antionkogenů, které tak ztrácejí schopnost účastnit se regulace buněčného cyklu, a chromozomální translokace mající za následek tvorbu chimérických fúzních proteinů odpovědných za tvorbu onkogenního fenotypu buňky.

K primárním cílům onkologického výzkumu patří charakterizace molekulárních rozdílů mezi normální a nádorovou buňkou, a to jak na úrovni exprese mRNA, tak na úrovni proteinů. K tomuto účelu byly vyvinuty technologie microarrays, které umožňují sledovat expresi až několika desítek genů v jednom experimentu a stanovit tak nádorově-specifické expresní profily. Jejich stanovení má význam jak pro diagnostiku a prognózu onemocnění, tak pro protinádorovou léčbu, neboť umožní optimální zacílení genové terapie.

Další perspektivní molekulárně-biologickou technologií, která se postupně stává účinným nástrojem terapie cílené proti nádorům způsobených chromozomálními translokacemi, je siRNA (small interfering RNA) navozující jev tzv. RNAi (RNA interference). Jde o mechanismus post-translačního utlumování genů (gene silencing) prostřednictvím specifické dvouřetězcové RNA o délce 21–23 bp. Pomocí této technologie se nám již podařilo dosáhnout prvních úspěšných výsledků na modelu Ewingova sarcomu, jednoho z nejčastějších kostních nádorů dětí.

OSMOTOLERANTNÍ KVASINKA

Zygosaccharomyces rouxii – IZOLACE AUXOTROFNÍCH MUTANTŮ A OPTIMALIZACE TRANSFORMAČNÍHO PROTOKOLU

LENKA PŘIBYLOVÁ a HANA SYCHROVÁ

Oddělení membránového transportu, Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: pribyll@biomed.cas.cz

Kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii*, druh blízce příbuzný modelové kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, se často vyskytuje jako kontaminace potravinových produktů s vysokým obsahem cukrů nebo solí jako jsou různé šťávy, omáčky, džemy nebo salátové zálivky; také se ale používá při výrobě tradičních slaných japonských pokrmů – sójové omáčky a koncentrované slané koření směsi zvané miso. Růst v prostředí s relativně nízkou aktivitou vody jí umožňuje její vysoká osmotolerance. Tato typická vlastnost je patrně způsobena přítomností specifických genů, jež umožňují kvasince *Z. rouxii* růst i v tak koncentrovaném prostředí, ve kterém již většina ostatních druhů kvasinek přežít nedokáže. Identifikace těchto specifických genů a jejich exprese v *S. cerevisiae* by tedy mohly významně přispět ke zlepšení vlastností průmyslových kmenů *S. cerevisiae*.

V *Z. rouxii* bylo dosud identifikováno pouze několik genů, většina z nich prostřednictvím jejich exprese v mutantních kmezech *S. cerevisiae* s poruchou v regulaci homeostáze kationtů (geny pro Na⁺-ATPasu nebo Na⁺/H⁺ antiporter) nebo v odpovědi na osmotický stres (např. HOG1, GPD1). Jednou z příčin nedostatečného poznání této kvasinky na molekulové úrovni je to, že buňky *Z. rouxii* dosud úspěšně odolávaly pokusům o rychlou a účinnou transformaci prostřednictvím DNA, existoval pouze jediný typ auxotrofních mutantů (Leu-) a pro ten bylo vytvořeno zatím jen několik málo vhodných vektorů.

V naší práci se nám podařilo izolovat první mutanty *Z. rouxii* Ura-, vytvořili jsme protokol pro účinnou transformaci

buněk *Z. rouxii* Leu- nebo Ura- prostřednictvím elektroporace a pro využití v *Z. rouxii* jsme zkonstruovali a testovali různé typy vektorů (centromerové, episomální, s markery ScLEU2, ZrLEU2, ScURA3).

V současnosti se pokoušíme o konstrukci disruptčních kazet pro přípravu mutantů s vícenásobnými auxotrofními mutacemi či s mutacemi způsobujícími osmosensitivitu. Tyto mutanty pak budeme transformovat genomovou bankou *Z. rouxii* (kterou připravíme v nejvhodnějším vektoru) a pokusíme se tak izolovat geny zodpovědné za vysokou osmotoleranci této kvasinky.

Tato práce byla podpořena granty GA ČR 204/01/0272 a AVOZ 5011922.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF BIOACTIVE CARBOHYDRATES CONTAINING N-ACETHYLHEXOSAMINES

JANA RAUVOLFOVÁ, M. KUZMA,
V. PŘIKRYLOVÁ, LENKA WEIGNEROVÁ,
and VLADIMÍR KŘEN

Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation,
Videňská 1083, 142 20 Prague 4
e-mail: rauwolf@biomed.cas.cz

The importance of oligosaccharides containing *N*-acetylhexosamines (HexNAc = GlcNAc; GalNAc; ManNAc) is increasing due to their biological activities. For example, oligosaccharides comprising ManNAc are important immunodeterminants of some pathogenic bacteria, β -GlcNAc moiety linked to galactose occurs as an essential core unit of glycoconjugates isolated from human milk, derivatives of chitoooligomers with GlcNAc moieties have high affinity for NKR-P1 protein, the major activating receptor at the surface of rat natural killer cells¹.

Unique non reducing di- and trisaccharides β -D-GlcNAc-(1 $\leftrightarrow$ 1)- β -D-Gal (I) and β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glc- α / β -(1 $\leftrightarrow$ 1)-

β -D-GlcNAc (II/III) were synthesized by *N*-acetylglucosaminyl transfer of β -GlcNAc moiety from pNP- β -GlcNAc onto D-galactose or lactose using β -*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus flavofurcatis*, respectively.

This project was supported by grants from Czech National Granting Agency No. 03/01/1018, and No. 204/02/P096/A, MSM grant ME 371 and Research Concept No. AVOZ5020903.

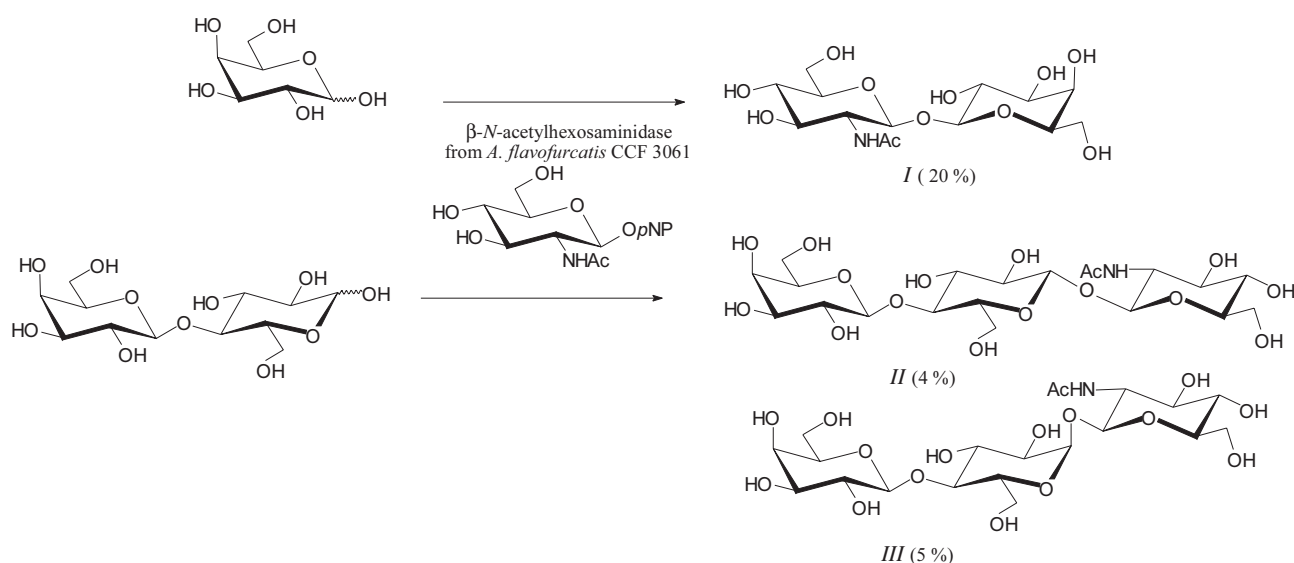
THERMOSTABILITY OF MULTIDOMAIN PROTEINS: PROPERTIES OF CHIMAERIC ELONGATION FACTORS EF-Tu COMPOSED OF DOMAINS OF MESOPHILIC-*Escherichia coli* EF-Tu AND THERMOPHILIC-*Bacillus stearothermophilus* EF-Tu

H. ŠANDEROVÁ^a, M. HŮLKOVÁ^a,
PETR MALOŇ^b, and JIŘÍ JONÁK^a

^aDepartment of Protein Biosynthesis, Institute of Molecular Genetics and ^bDepartment of Peptide Chemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6

Elongation factors EF-Tu/EF-1 α are abundant cellular proteins. They are highly homologous in the broad range of prokaryotic and eukaryotic organisms. These monomeric three-domain GTPases are involved in translation as universal carriers of aminoacyl-tRNAs to the A-site of the ribosome. Their GTPase centre and guanine nucleotide binding site are situated in the *N*-terminal domain (G-domain). All three domains participate in binding of aminoacyl-tRNA.

The EF-Tu proteins from *E. coli* and *B. stearothermophilus* were examined by the chimaerization approach to evaluate the contribution of the domains to the thermostability of these proteins. Molecules of EF-Tus were genetically dissected into three corresponding domains and the domains combined to form chimaeric EF-Tu proteins. The resulting six recombinant



mesophile/thermophile chimaeric EF-Tus, together with the recombinant *E. coli* and *B. stearothermophilus* EF-Tus and isolated G-domains, were characterized with regard to GDP and GTP binding activity, intrinsic GTPase activity and thermostability. The thermostability was measured both as the maintenance, at increasing temperatures, of a defined functional state by the ability to bind GDP and GTP, and to hydrolyze GTP and, independently, using CD spectroscopy, as the maintenance of the α -helix content.

The kinetic parameters of the EF-Tus, chimaeric EF-Tus and G-domains from *B. stearothermophilus* and *E. coli* were determined. *B. stearothermophilus* EF-Tu displayed affinity for GDP and GTP quite comparable with those of *E. coli* EF-Tu (hundredfold higher affinity for GDP than for GTP), and these properties, unlike in the *E. coli* G-domain, were intrinsic to the *B. stearothermophilus* G-domain itself.

The thermostability of the EF-Tus was found to be primarily determined by the stability of the G-domain. The thermophilic G-domain set up an about 20 °C higher basic level of thermostability than the mesophilic G-domain. The final thermostability of the EF-Tus was the sum of the thermostability contributions of G-domains and domains 2 and 3, which added additional 12–23 °C, depending on the domain origin and GTP or GDP conformation.

The GDP form of *E. coli* EF-Tu was more thermostable than the GTP form and *E. coli* domain 2 was mainly responsible for this difference. In contrast to *E. coli* EF-Tu, the thermostability of GDP and GTP conformations of *B. stearothermophilus* EF-Tu, *E. coli* G-domain and *B. stearothermophilus* G-domain was almost identical.

One of the reasons for the assembly of EF-Tu molecules into three-domain structures appears to be a substantial increase of the thermal stability and modulation, by domains 2+3, of the efficiency (up or down) of the functions executed by their G-domains. The thermostability of the EF-Tu was not related to the affinity to GDP and GTP.

This work was supported by grants 204/98/0863 and 303/02/0689 from the Grant Agency of the Czech Republic (to J. J.).

OVlivNŮJÍ BIS-INTERKALÁTOROVÉ PEPTIDY AGREGACI PRIONOVÉHO PEPTIDU 106-26 V PŘÍTOMNOSTI dsDNA?

JAROSLAV ŠEBESTÍK^a, JAN HLAVÁČEK^b
a IVAN STIBOR^a

^aVysoká škola chemicko technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Charakteristickou vlastností prionových onemocnění je akumulace buněčného prionového proteinu (PrP^C) a to v jeho toxické konformaci (PrP^{Sc}) v mozku. PrP^{Sc} je na rozdíl od přirozeného PrP^C částečně odolný vůči štěpení proteasami, protože vysoký obsah β -sheetu vede k vzniku nerozpustných agregátů a amyloidních vláken. Peptid, jehož sekvence odpovídá 106–126 zbytku lidského prionového proteinu (HuPrP106-26), velmi dobře napodobuje vlastní protein a dokonce je

toxický pro neurony *in vitro*^{1,2}. Proto je tento peptid používán jako model infekčního PrP^{Sc}. Bylo zjištěno, že nukleové kyseliny jsou nezbytné pro experimentální přenos BSE na myš a zároveň urychlují agregaci prionového peptidu v roztoku³. dsDNA, které interagují s 9-aminoakridinem (interkalátor), indukují polymerizaci PrP^C částečným rozvinutím proteinu^{4,5}. Interkalace akridinu do DNA způsobí změnu její konformace a tedy schopnost rozpoznat PrP. Přibližně platí, že čím více vhodně umístěných interkalátorových jednotek molekula obsahuje, tím vyšší je její interakční konstanta s DNA a schopnost zabránit kompetiční vazbě jiných látek např. HuPrP106-26. Knihovna bis-interkalátorových peptidových derivátů s 9-aminoakridinem pro poziční sken (PSL) byla připravena na modifikované Merrifieldově pryskyřici⁶. Dále byla připravena jedna směsná knihovna obsahující 9826 látek z 51 PSL podknihoven následujících vzorců Acr-Gly-X-Y-Z-NHCH₂CH₂NH-Acr a Acr-Gly-X-Y-Z-NHCH₂CH₂NH-Z-Y-X-Gly-Acr. Látky s největším vlivem na interakci HuPrP106-26 a dsDNA jsou vyhledávány pomocí reverzní dialýzy směsné knihovny a fluorescenčním skenem PSL, dsDNA, HuPrP106-26 a barviva na amyloid.

Tato práce byla podpořena GA ČR grant č. 203/02/1379.

LITERATURA

1. Tagliavini F., Prelli F., Verga L., Giaccone G., Sarma R., Gorevic P., Ghetti B., Passerini F., Ghibaudi E., Foroloni G., Salmons M., Bugiani O., Frangione B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 9678 (1993).
2. Foroloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmons M., Bugiani O., Tagliavini F.: Nature 362, 543 (1993).
3. Nandi P. K.: Arch. Virol. 143, 1251 (1998).
4. Nandi P. K., Leclerc E.: Arch. Virol. 144, 1751 (1999).
5. Nandi P. K., Leclerc E., Nicole J.-C., Takahashi M.: J. Mol. Biol. 322, 153 (2002).
6. Šebestík J., Hlaváček J., Stibor I.: Peptides (2002), v tisku.

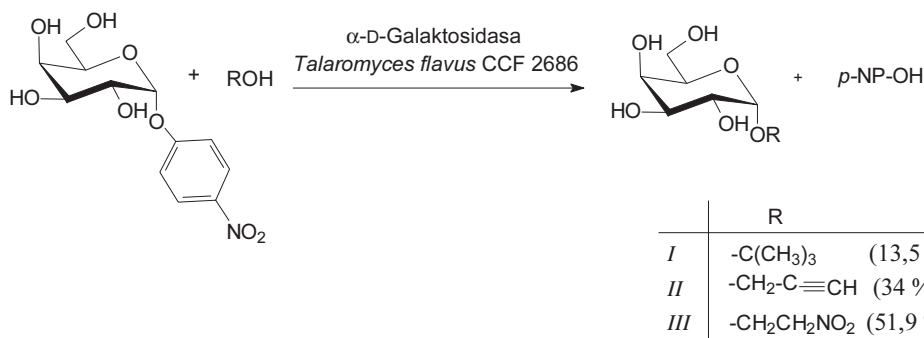
ENZYMOVÉ GLYKOSYLACE STERICKY BRÁNĚNÝCH ALKOHOLŮ

PAVLA SIMERSKÁ, A. PIŠVEJCOVÁ,
LENKA WEIGNEROVÁ, M. KUZMA
a VLADIMÍR KŘEN

Laboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: simerska@biomed.cas.cz

Podstatou této práce je studium nových transglykosylačních enzymových reakcí v chemii sacharidů se zaměřením na přípravu nových glykosidů. Glykosidasy při transglykosylaci preferují primární alkoholové skupiny, které jsou reaktivnější a přístupnější.

Testovali jsme rozsáhlou sérii alkoholů (primárních, sekundárních i terciálních) jako akceptorů při transglykosylačních reakcích. Orientovali jsme se hlavně na glykosylaci stericky bráněných alkoholů, které až na výjimky doposud nebyly glykosylovány pomocí glykosidas. Například *terc*.bu-



tylalkohol je považován za inertní polární rozpouštědlo, které enzymově nelze glykosylovat.

*Terc.*butyl- α -D-galaktopyranosid (I), propargyl- α -D-galaktopyranosid (II) a 2-nitroethyl- α -D-galaktopyranosid (III) byly připraveny transglykosylačními reakcemi katalyzovanými α -D-galaktosidasou z *Talaromyces flavus* CCF 2686. Bylo zjištěno, že jejich příprava je možná i za použití některých α -D-galaktosidas také pomocí reverzní hydrolyzy s volnou galaktosou jako donorem glykosylu.

Tento projekt je financován grantem 203/01/1018, 204/02/P096 z GA ČR a Výzkumným záměrem MBÚ AV ČR AV0Z5020903.

VLIV PERIFERNĚ VYVOLANÉ ZÁNĚTLIVÉ REAKCE NA EXPRESI MRNA KÓDUJÍCÍ CYKLOOXYGENASU V MÍŠE POTKANŮ WISTAR ALBINO

J. SLÍVA, M. PROCHÁZKOVÁ, T. DOLEŽAL, V. MORAVEC a E. ŽDÁRSKÝ

*Farmakologický ústav, 3. lékařská fakulta, Karlova univerzita, Ruská 87, 100 00 Praha 10
e-mail: Jiri.Sliva@lf3.cuni.cz*

Prostaglandiny byly popsány jako klíčové mediátory bolesti při zánětlivém podnětu. Pro jejich syntézu z kyseliny arachidonové je esenciální přítomnost enzymu cyklooxygenasy, která se dnes rozlišuje na dvě hlavní isoformy, a sice COX-1 a COX-2. Ačkoliv se v míše nacházejí obě tyto isoformy, doposud není zcela objasněna přesná a detailní úloha obou těchto enzymů, ačkoliv jsou předmětem mnoha studií. Prostaglandiny vyvolávají tzv. centrální sensitizaci v zadních rozech míšních. Bylo popsáno, že COX-2 se indukuje asi 6 hodin po zánětlivé stimulaci. Role COX-1 je zatím nejasná. V naší experimentální studii se snažíme objasnit jejich úlohu, resp. sledujeme expresivitu mRNA kódující tyto isoformy v oblasti lumbální míchy u potkanů kmene Wistar albino. Jako zdroj nociceptivního stimulu slouží aplikace 5% formalinu do dorza zadní pravé tlapky. První experimentální skupina byla usmrcena po 6-ti hodinách a druhá po 24 hodinách od aplikace formalinu. Kontrolním skupinám bylo aplikováno adekvátní množství fyziologického roztoku. Z odebraného vzorku míchy izolujeme celkovou RNA, provádíme reverzní transkripci

do cDNA a cestou polymerasové řetězové reakce v reálném čase stanovujeme množství exprimované RNA. Předběžné výsledky nasvědčují zvýšenou koncentraci cyklooxygenasy po nociceptivní stimulaci.

SPECIFICKÉ GLYKOPEPTIDY IMUNOGLOBULINU IgG A JEJICH IZOLACE

M. SLOVÁKOVÁ^a, Z. BÍLKOVÁ^a, J. JEŽOVÁ^a, Š. OUZKÁ^a a J. LENFELD^b

^aKatedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, ^bÚstav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Praha

Peptidové mapování je základní technika umožňující studium primární struktury proteinů. Poskytuje informaci o expresi požadované aminokyselinové sekvence a o postrančních modifikacích proteinu. Postup mapování zahrnuje enzymatické nebo chemické naštěpení proteinu proteasami na množství menších peptidových fragmentů, následuje jejich separace a detekce.

Vzhledem k vysoké heterogenitě některých molekul, např. IgG (v sekvenci AMK v oblasti vazebného místa a glykosylaci), a vzhledem k jeho vysoké molekulové hmotnosti (150 000 daltonů), je vhodné zařadit předseparační krok, pomocí něhož se podaří oddělit glykosylované části molekuly (glykopeptidy specifické pro daný glykoprotein) ze složité směsi peptidových fragmentů. Tyto glykopeptidy umožní identifikaci charakteristických peptidových map IgG pomocí MS.

K izolaci a analýze glykopeptidů molekuly IgG byly použity enzymové a bioafinitní reaktory imobilizací enzymů papainu, trypsinu, neuraminidasy, beta-galaktosidasy a lektinů *Bandeira simplicifolia* I, II a Conacanalínu A na magnetické makro- a mikropartikelky. K imobilizaci byly použity nově vyvinuté nosiče neporézního charakteru typu poly(HEMA-co-EDMA), poly(HEMA-GMA) a makroporézní perlová celulóza modifikovaná dihydrazidem kyseliny adipové (ÚMCH AV ČR).

Způsob imobilizace se liší povahou proteinu: enzymy trypsin, papain a beta-galaktosidasa byly imobilizovány po aktivaci nosiče trichlorotriazinem, u neuraminidasy bylo využito její glykoproteinové části molekuly k orientované imobilizaci, lektiny byly imobilizovány prostřednictvím vysoko-

afinitního interakce biotin-streptavidin. Ihned po imobilizaci, ale i v průběhu skladování, je nutné sledovat aktivitu imobilizovaných enzymů. Čistota všech izolovaných a štěpených vzorků, tj. purifikovaný IgG, izolovaný Fc fragment a štěpné produkty IgG a Fc po aplikaci enzymových reaktorů, je kontrolována pomocí SDS/PAGE.

Tento projekt vznikl za finanční podpory grantu GA ČR č. 203/02/0023 a grantu MŠMT ČR č. 253100002.

TRANSCRIPTOME OF *Treponema pallidum*: GENE EXPRESSION PROFILE DURING EXPERIMENTAL RABBIT INFECTION

DAVID ŠMAJS^a, PETRA MATĚJKOVÁ^a,
STEVEN J. NORRIS^b,
and GEORGE J. WEINSTOCK^c

^aDepartment of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Joštova 10, 662 43 Brno, ^bDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas, Houston Medical School, 6431 Fannin Street, Houston TX 77030, ^cHuman Genome Sequencing Centre, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Alkek N1519, Houston, TX 77030, USA

DNA microarray technology was utilized to study gene expression by the syphilis spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols) during infection of rabbits. Microarrays containing all 1039 annotated ORFs of *T. pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols) were printed on glass slides. For 1034 ORFs (out of 1039), signals higher than the threshold (average of negative control spots + 3 SDs) were detected for both RNA and DNA probes. Total RNA from *T. pallidum* isolated from rabbit testes 10 days post infection was labeled and standardized by cohybridization of the same arrays with treponemal chromosomal DNA labeled with a different fluorescent marker. This internal standardization technique proved to be highly reproducible and to decrease the impact of variables such as host nucleic acid contamination or variable target DNA lengths. The most highly transcribed genes were found to correlate with the most conspicuous spots identified by two dimensional gel electrophoresis, indicating that the transcript levels generally corresponded to the relative protein concentrations. Genes with high transcript concentrations included those encoding flagellar filament and cytoplasmic filament proteins, prominent lipoproteins and membrane proteins, chemotaxis regulatory proteins, a V-ATPase operon, and certain metabolic enzymes such as glycolytic pathway enzymes. Independent quantitation of the expression of 84 *T. pallidum* genes using real-time RT-PCR approach yielded a high degree of correlation ($r = 0.94$). Characterization of the *T. pallidum* transcriptome during experimental infection provides further insight into the importance of gene expression levels in the survival and pathogenesis of this bacterium in the mammalian host.

HYDROLÝZA NITRILŮ POMOCÍ ENZYMŮ VLÁKNITÉ HOUBY *Aspergillus niger* K10

RADKA ŠNAJDROVÁ^a, L. MARTÍNKOVÁ^a,
K. NICOLAOU^a, D. CRESTIA^b, V. MYLEROVÁ^a,
J. BOLTE^b a VLADIMÍR KŘEN^a

^aLaboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, ^bUniversité Blaise Pascal, Clermont – Ferrand, Francie
e-mail: snajdrova@biomed.cas.cz

Nitrily jsou organické sloučeniny, které jsou vyráběny ve velkém měřítku v chemickém průmyslu (akrylonitril, acetonitril apod.) a zároveň jsou využívány jako prekurzory při syntézách amidů a kyselin. Chemická hydrolýza nitrilů má řadu nevýhodných aspektů, jako např. racemizaci, vysoké energetické nároky. Jednou z možností, jak těmto problémům předcházet, je použití mikrobiálních enzymů. Jejich nesporným přínosem jsou především stereoselektivita, regioselektivita a chemoselektivita a mírné reakční podmínky.

Pro biotransformaci nitrilů byla použita vláknitá houba *Aspergillus niger* K10 produkující enzymy, které se účastní hydrolýzy nitrilů. Enzymy pro hydrolýzu nitrilů nebyly zatím u hub popsány. K indukci těchto enzymů docházelo v mediu obsahujícím 3-kyanopyridin. Hydrolýza nitrilové skupiny na karboxylovou byla katalyzována celými buňkami nebo buněčným extraktem. Pro studium substrátové specifity hydrolytických enzymů byly použity aromatické a arylalifatické nitrily, substituované akrylonitrily, kyanopyridiny a kyanobenzoáty. Nejeefektivněji ze všech substrátů byl transformován benzonitril. Při transformaci dikyanobenzenů byla selektivně hydrolýzována pouze jedna kyanoskupina (schéma 1). Nitrilhydratasa byla aktivní v širokém rozmezí hodnot pH (4–9). Maxima aktivity bylo dosaženo při pH 7. Při hydrolýze nitrilů pomocí buněčného extraktu byly detegovány amidy, jejichž vznik je katalyzován enzymem nitrilhydratasou. Přítomnost tohoto enzymu nebyla zatím prokázána u jiných vláknitých hub.

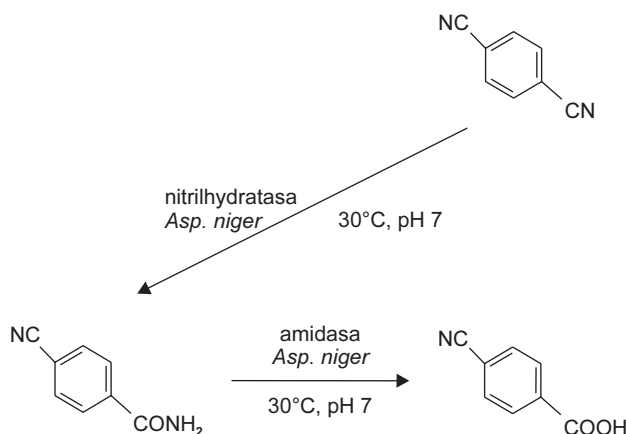


Schéma 1

Tento projekt je financován následujícími granty: A 4020213 GA AV ČR, ME 579 MŠMT, OC D25.001 MŠMT a BARRANDE 2002-020-1, výzkumný záměr MBÚ AVOZ 5020903.

SYNTEZA GLYKOSIDŮ 2-SUBSTITUOVANÉHO CYKLOHEXANOLU

PAVLA SOCHŮRKOVÁ, MARIE ZAREVÚČKA
a ZDENĚK WIMMERÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: reitmayer@uochb.cas.cz

Do série bioanalogů hmyzích juvenilních hormonů (juvenoidů) patří také deriváty 2-substituovaného cyklohexanolu nesoucí karbamátovou skupinu (např. ethyl-*N*-{2-[4-(2-hydroxycyklohexylmethyl)fenoxy]ethyl}karbamát; *II*). Přípravu této sloučeniny jsme prováděli redukcí ethyl-*N*-{2-[4-(2-oxocyklohexylmethyl)fenoxy]ethyl}karbamátu (*I*; schéma 1) chemickou i enzymatickou cestou. Produktem těchto redukcí jsou racemické nebo chirální alkoholy, které byly použity pro přípravu alkylglykosidů (juvenogenů). Juvenogeny jsou látky, které se vyznačují nízkou biologickou aktivitou, ale jsou schopné po aplikaci do organismu uvolňovat biologicky aktivní část molekuly (juvenoid) biotickou cestou. Během tohoto výzkumu jsme se zaměřili na přípravu alkylglykosidů (*IVa,b*) výše uvedených alkoholů (akceptorů glykosylu) pomocí derivátů bromglukosy (*IIIa*) a bromgalaktosy (*IIIb*) (donorů glykosylu). Glykosylace jsme prováděli Koenigsovou-Knorrovou metodou (schéma 1) za přítomnosti promotoru (CdCO_3).

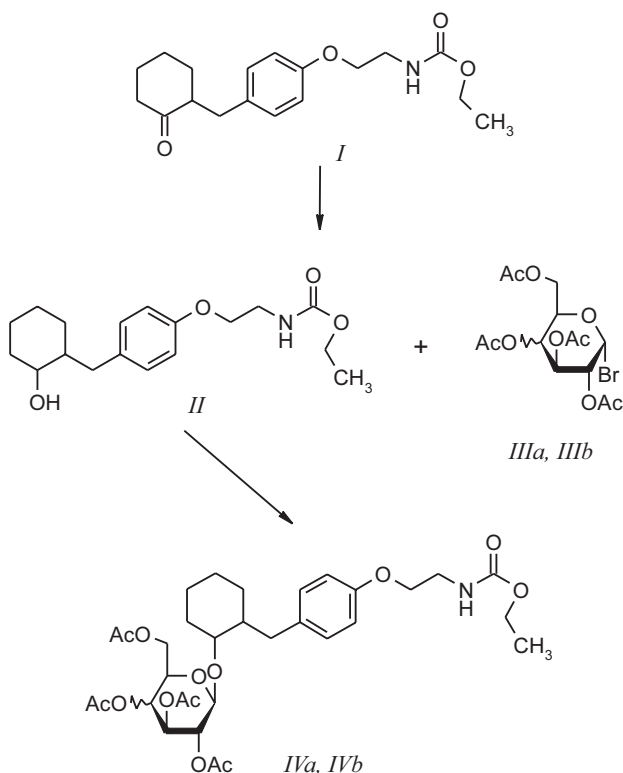


Schéma 1

Autoři děkují za finanční podporu tohoto výzkumu grantu GA ČR 203/02/0166.

LITERATURA

- Schmidt R. R., Jung K.-H., v: *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Hanessian S., ed.), str. 283. Dekker 1997.

SYNTEZA DERIVÁTŮ THIACALIX[4]ARENU S VOLITELNOU FLEXIBILITOU MAKROCYKLU

VÁCLAV ŠTASTNÝ^a, PAVEL LHOTÁK^a,
IVAN STIBOR^a, HANA PETŘÍČKOVÁ^b
a JAN SÝKORA^b^aKatedra organické chemie a ^bKatedra chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: statnyv@vscht.cz

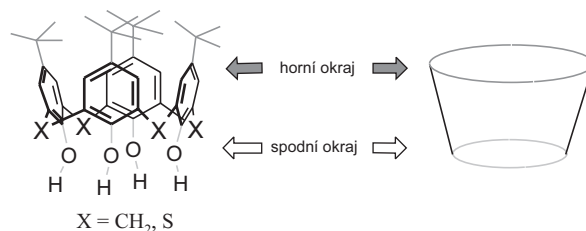
Calix[*n*]areny¹ (obr. 1) a jejich deriváty hrají v posledních letech důležitou roli v oblasti supramolekulární chemie, zvláště v procesech self-assembly² a v syntéze receptorů pro komplexaci iontů i organických molekul³.

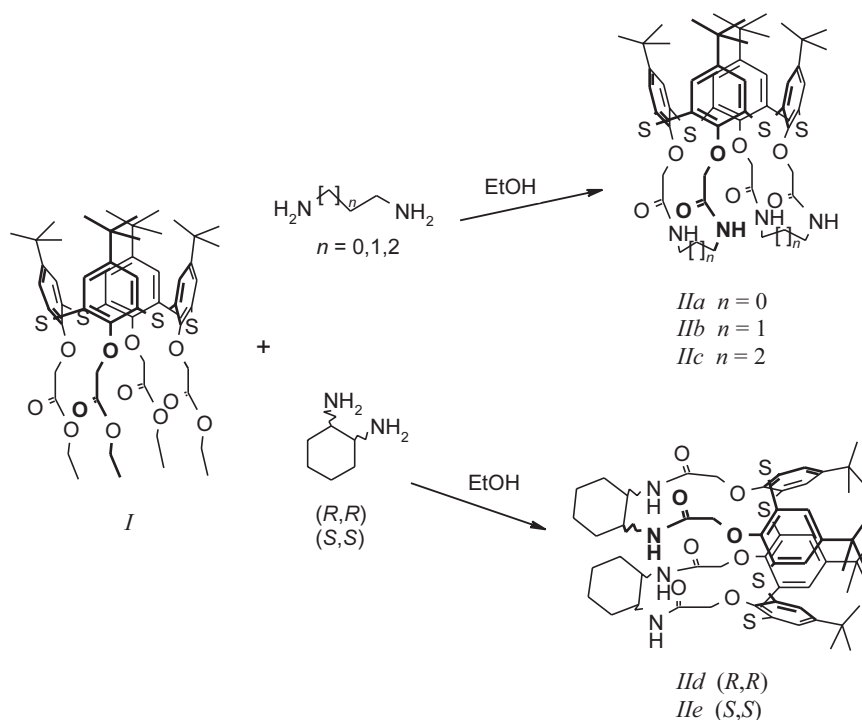
V současné době je v oblasti calixarenové chemie značná pozornost upřena k thiacalixarenům (obr. 1), kde jsou můstkové methylenové skupiny nahrazeny atomy síry⁴. Zjistilo se, že některé jejich vlastnosti jsou v chemii calixarenů bezprecedentní⁵. Vnesení atomu síry do molekuly calixarenu znamená přítomnost nového reakčního centra v makrocyklu a s tím spojenou novou možnost jeho derivatizace i další substituce spodního a horního okraje thiacalix[4]arenu^{6–8}.

V naší práci jsme navázali na předešlé zkušenosti s derivatizací spodního okraje thiacalix[4]arenu a využili námi dříve připraveného⁹ cone konformeru „tetraacetátu“ *I* (obr. 2). Jeho aminolýzou¹⁰, účinkem alifatických α,ω -diaminů byla připravena zajímavá série derivátů *IIa–c* s intramolekulárně přemostěným spodním okrajem.

Tyto molekuly zaujímají v tuhém stavu i v roztoku cone konformaci a díky netypickému proximálnímu přemostění fenolických jader vykazují C_{2v} symetrii. Tato jednoduchá syntetická transformace s sebou přinesla řadu nových možností. Volbou amidických můstků různé délky jsme dosáhli rozdílné flexibility jednotlivých makrocyklů. Použitím chirálního diaminu (*R,R*- nebo *S,S*-diaminocyklohexanu) jsme dospěli k příslušným thiacalixarenovým enantiomerům *IIa,e*. Dále se nám do budoucna nabízí možnost přípravy inherentně chirálních thiacalix[4]arenů s C_2 symetrií.

Z vyřešených krystalových struktur *IIa–c* je patrné, že tyto deriváty představují makrocyclické struktury s velmi dobře preorganizovaným systémem amidických funkcí. Spojíme-li s tímto faktem přítomnost můstkových atomů síry a zmíněnou





Obr. 2.

možnost ovlivnění flexibility, mohly by být tyto makrocycly vhodnými ligandy pro koordinaci lanthanidových iontů (Tb^{3+} , Eu^{3+} , Sm^{3+} a Pr^{3+}). Podobné komplexy na bázi thiacalix-[4]arenů jsou v poslední době zkoumány v důsledku své vysoké luminiscenční schopnosti¹¹. Podle předpokladů uvedených v cit.¹¹ by navíc vhodná substituce spodního okraje thiacalixarenu měla v těchto případech značně zvyšovat luminiscenci v důsledku snadnější inkluze daného iontu a vyloučení koordinace molekul rozpouštědla s rušivými účinky. Právě amidické skupiny se již dříve ukázaly být vhodnými kandidáty¹².

Další syntetickou modifikací, kterou se nyní intenzivně zabýváme, je oxidace můstkových atomů síry. Na příkladu derivátu *IIa* budou diskutovány možnosti oxidace můstkových atomů síry. Volbou vhodného činidla zde lze dosáhnout zajímavé chemo- i regioselektivity.

LITERATURA

- Asfari Z., Böhmer V., Harrowfield J., Vicens J. (Eds.): *Calixarenes 2001*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001.
- Rudkevich D. M.: *Calixarenes 2001*, 155.
- Arduini A., Pochini A., Secchi A., Ugozzoli F.: *Calixarenes 2001*, 457.
- Kumagai H., Hasegawa M., Miyazaki S., Sato Y., Hori T., Ueda S., Kamiyama H., Miyano S.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 3971 (1997).
- Lhoták P., Dudic M., Stibor I., Petříčková H., Sýkora J., Hodačová J.: *Chem. Commun.* **8**, 731 (2001).
- Mislin G., Graf E., Hosseini M. W., Cian A., Fischer J.: *Chem. Commun.* **13**, 1345 (1998).
- Katagiri H., Iki N., Hattori T., Kabuto C., Miyano S.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 779 (2001).

- Lhoták P., Svoboda J., Stibor I., Sýkora J., *Tetrahedron Lett.* **43**, 7413 (2002).
- Lhoták P., Štátný V., Zlatušková P., Stibor I., Michlová V., Havlíček J., Sýkora J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65**, 757 (2000).
- Yong Wu, Xiao-ping Shen, Chung-ying Duan, Yong-jiang Liu, Zheng Xu: *Tetrahedron Lett.* **40**, 5749 (1999).
- Iki N., Horiuchi T., Oka H., Koyama K., Morohashi N., Kabuto C., Miyano S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **11**, 2219 (2001).
- Pochini A. et al.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 878.

POLYMORFISMY V ABCG5 A ABCG8 TRANSPORTÉRECH A LIPIDY V PLAZMĚ

JANA ŠTEFKOVÁ, JAROSLAV HUBÁČEK
a RUDOLF POLEDNE

Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Institut klinické a experimentální medicíny, Centrum experimentálního výzkumu chorob srdce a cév, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4
e-mail: jana.stefkova@mk.cvut.cz

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou předčasného úmrtí ve všech vyspělých státech. Jedním z hlavních rizikových faktorů předčasného onemocnění kardiovaskulární chorobou je vysoká hladina lipidů v plazmě. Příspěvek genetických a environmentálních faktorů na hladinu lipidů v plazmě je přibližně stejný. ABCG5 a ABCG8 transportéry jsou zodpovědné za transport sterolů. Tyto proteiny mají nápadnou homologii v genové struktuře. Mutace v těchto genech způsobuje vzácnou formu onemocnění zvanou β -sitosterolemie.

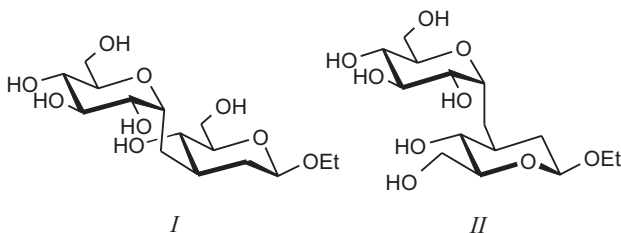
Naše práce se zabývá analýzou polymorfismů způsobujících aminokyselinové záměny v ABCG5 (C1950→Gln604Glu) a ABCG8 (G145C→Asp19His, A251G→Tyr54Cys, C1289A→Thr400Lys a C1984T→Ala632Val) a jejich vlivem na hladinu lipidů v plazmě. Použitím PCR a restriční analýzy jsme měřili polymorfismy ve dvou studovaných vzorcích. První vzorek zahrnuje dvě skupiny dětí, nízkocholesterolemickou (86 dětí) a vysokocholesterolemickou (82 dětí) skupinu, které byly vybrány z opačných částí distribuční křivky cholesterolemie 2000 dětí. Druhým studovaným vzorkem byla 8 letá kohorta 1 % reprezentativního vzorku české populace vybrané v roce 1988 ve věkové skupině 25–64 let. V roce 1996 byla tato skupina znovu vyšetřena. Jedná se o 131 nepříbuzných mužů a 154 žen. Z našich výsledků je zřejmé, že tři polymorfismy mají spojitost s koncentrací lipidů v plazmě. U vysokocholesterolemických jedinců měli nositelé alely Asp19Asp vyšší cholesterol než jedinci nesoucí alelu s His ($5,55 \pm 0,65$ vs. $4,99 \pm 0,19$, $p < 0,001$). Dále bylo zjištěno, že pokles celkového a LDL cholesterolu mezi roky 1988 a 1996 je u mužů determinován jiným polymorfismem než u žen. U mužů se projevil vliv polymorfismu Thr400Lys, kdy u jedinců nesoucích alelu Thr400Thr byl pokles u celkového cholesterolu z $6,42 \pm 0,84$ na $5,51 \pm 0,57$, $p < 0,03$ a u LDL cholesterolu z $3,96 \pm 0,21$ na $3,34 \pm 0,16$, $p < 0,04$. U žen se projevil vliv polymorfismu Tyr54Cys. Největší pokles byl zaznamenán u jedinců nesoucích alelu Tyr54Tyr a to u celkového cholesterolu z $6,00 \pm 0,67$ na $5,53 \pm 0,62$, $p < 0,04$ a u LDL cholesterolu z $3,75 \pm 0,21$ na $3,21 \pm 0,14$, $p < 0,03$.

STEREOSELEKTIVNÍ PŘÍSTUP K SYNTÉZE α -(1 → 3)-C-DISACHARIDŮ OBSAHUJÍCÍCH DEOXYHEXOPYRANOSU

PETR ŠTĚPÁNEK a LADISLAV KNIEŽO

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: petr.stepanek@vscht.cz

Zjištění, že oligosacharidy hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci, vyvolalo vlnu zájmu o sacharidy a jejich analoga. V poslední době se pozornost soustředila na jejich využití jako potencionálních inhibitorů glykosidas, resp. glykosyltransferas, které patří k nejdůležitějším enzymům řídící základní funkce organismů¹. Jednou ze skupin intenzivně studovaných látek, které vykazují zajímavou biologickou aktivitu, jsou C-disacharidy, což jsou analoga O-disacharidů, ve kterých je glykosidický atom kyslíku nahrazen methylenovou skupinou, čímž se tyto látky stávají odolné vůči glykosidasám.



Dosavadní způsoby přípravy C-disacharidů byly hlavně postaveny na vytvoření C–C vazby mezi dvěma monosacharidy, popř. na tvorbě C–C vazby mezi monosacharidem a bicyklickou sloučeninou^{1,2}.

Prezentovaný přístup je založen na postupném budování nové dideoxyhexopyranosy spojené s původním sacharidem –CH₂– skupinou. Umožňuje tedy za použití snadno dostupných syntonů připravit široké spektrum nových α -(1 → 3)-C-disacharidů, kde má nová dideoxyhexopyranosa konfiguraci D-, nebo L- (I, II).

Práce byla provedena v rámci řešení výzkumného záměru MŠMT č. 223300006.

LITERATURA

1. Du Y., Linhardt P. J., Vlahov I. R.: *Tetrahedron* 54, 9913 (1998).
2. Chapleur Y., ed.: *Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods*. Wiley, Weinheim 1998.

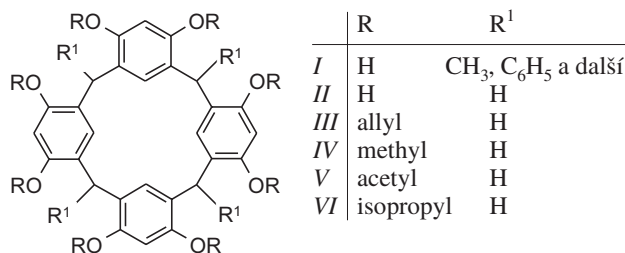
OKTA-O-ISOPROPYLCALIX[4]RESORCINAREN A PARCIÁLNÍ ODŠTĚPENÍ CHRÁNICÍCH SKUPIN

JAN ŠTURSA, JITKA MORAVCOVÁ a HANA DVOŘÁKOVÁ

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Calix[4]resorcinareny typu I jsou velmi často studované látky využitelné jako stavební bloky v supramolekulární chemii¹. Resorcinaren II byl studován méně už z toho důvodu, že ho nelze připravit jednoduchou kysele katalyzovanou kondenzací formaldehydu a resorcinolu. Doposud popsané práce využívají cestu přes oktaallylether III nebo oktamethylether IV, které byly připraveny ve výtěžku 54 a 34 % z příslušného 2,4-dialkoxybenzylalkoholu za přítomnosti Sc(OTf)₃ po 5 hodinách². Pokud byla reakce katalyzována kyselinou trifluorotovou, oktamethylether IV byl izolován ve výtěžku 95 % po 18 hodinách reakce. Chránicí skupiny byly z methyletheru IV odstraněny pomocí BBr₃ a resorcinaren II byl izolován ve formě oktaacetátu V, přičemž výtěžek³ těchto dvou kroků byl 25 %.

My jsme jako výchozí látku zvolili dosud nepopsaný 2,4-diisopropoxybenzylalkohol, který jsme připravili alkylací 2,4-dihydroxybenzaldehydu a následnou hydrogenací v celkovém výtěžku 85 %. 2,4-Diisopropoxybenzylalkohol poskytl v přítomnosti (CH₃)₃SiCl během 1 hodiny za normální



teploty oktaisopropylether VI, který jsme izolovali krystalicky ve výtěžku 94 % bez jakékoliv čistící operace.

Při odstraňování chránících skupin z oktaisopropyletheru VI pomocí BCl_3 jsme zjistili, že etherové vazby se štěpí postupně a vznikají tak parciálně alkylované resorcinareny. Jednotlivé produkty jsme izolovali a charakterizovali.

Práce byla podporována VZ 223300006.

LITERATURA

1. Timmerman P., Verboom M., Reinhoudt D. N.: *Tetrahedron* 52, 2663 (1996).
2. Konishi H., Sakakibara H., Kobayashi K., Morikawa O.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1999, 2583.
3. Olusegun M. F., Al-Farhan E., Keehn P. M., Stevenson R.: *Tetrahedron Lett.* 35, 65 (1994).

REKOMBINANTNÍ VIRUS VAKCINIE EXPRIMUJÍCÍ UPRAVENÝ PROTEIN E7 LIDSKÉHO PAPILOMAVIRU HPV-16 A INTERLEUKIN IL-12 JAKO MODELOVÁ VAKCINA PROTI NÁDORŮM VYVOLANÝM PAPILOMAVIRY

JANA ŠUBRTOVÁ, LUŽA KUTINOVÁ,
ŠÁRKA NĚMEČKOVÁ, PETR HAINZ,
VOJTĚCH ŠROLLER, PAVEL GABRIEL,
a PAVEL OTÁHAL

Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 120 00 Praha 2

Souvislost mezi vznikem rakoviny děložního čípku člověka a infekcí vysokorizikovými typy papillomavirů (např. HPV-16, HPV-18) byla v minulých letech bez pochyb prokázána. Mnoho světových laboratoří se proto velmi intenzivně věnuje studiu jejich vzájemného vztahu a zejména vývoji účinné a zároveň bezpečné vakcíny pro prevenci a léčbu nádorů vyvolaných papillomaviry.

V naší laboratoři se zabýváme přípravou vakcín založených na rekombinantním viru vakcinie (rVV), který je vhodným vektorem zejména pro svou schopnost pojmout značné množství cizí DNA a účinně ji exprimovat v různých typech buněk. Dalším kladem je nepochybně velká zkušenost s použitím vakcinie v očkovací praxi v minulosti.

Pro případné praktické využití je pochopitelně třeba použít vektor maximálně bezpečný, který by si zároveň zachoval schopnost účinně imunizovat. Proto k našim konstrukcím používáme vakcíniový kmen MVA (Modified Virus Ankara), který má delece v celé řadě genů, takže se ve většině savčích buněk téměř nebo vůbec nereplikuje. Jeho imunizační schopnosti testujeme. Pracujeme též s kmenem Praha 13 (P13), který je virulentnější, ale má dobré imunizační vlastnosti.

Účinnost imunizace testujeme na myším modelu *in vivo* i *in vitro*. Po imunizaci virem myši čelíme nádorovými buňkami TC-1 a sledujeme růst nádorů. *In vitro* testujeme buněčnou imunitu, a to dvěma testy, IFN- γ ELISPOT a „tetramer testem“.

Pro odebrání slezin izolujeme lymfocyty, které používáme

pro testy imunity přímo nebo je *in vitro* restimulujeme peptidem HPV-16 E7(49–57). Testem ELISPOT detegujeme množství buněk produkujících IFN- γ , „tetramer testem“ přímo zjistíme množství cytotoxických T-lymfocytů specifických pro peptid HPV-16 E7(49–57). Pracujeme s MHC-I tetramerem H-2Db/HPV-16 E7(49–57), který specificky fluorescenčně označí příslušné CTL, což pak změříme na průtokovém cytometru.

Dobré imunizační vlastnosti po podání viru exprimujícího fúzní protein Sig E7 LAMP, u kterého je zajištěna lokalizace E7 v endozomálním a lyzozomálním kompartmentu¹, jsme již ověřili v minulosti. Snažíme se však nalézt imunizační agens s ještě lepšími vlastnostmi. Zkonstruovali jsme dvojité rekombinantní virus, který kromě Sig E7 LAMP exprimuje ještě obě podjednotky cytokinu interleukinu 12 (IL-12), který by měl pozitivně působit na regresi nádorů².

V imunizačních experimentech jsme pokusy *in vivo* a *in vitro* zjistili, že virus MVA Sig E7 LAMP vyvolává podstatně slabší imunitní odpověď než P13 Sig E7 LAMP. U dvojité rekombinanty MVA Sig E7 LAMP IL-12 se imunitní odpověď vzhledem k jednoduché rekombinantě MVA Sig E7 LAMP prakticky nezměnila. Vložení genů pro IL-12 do viru P13 SigE7LAMP výrazně snížilo jeho imunogenost, což je vysvětlitelné zjištěným značným omezením množení tohoto viru oproti rodičovské rekombinantě. Podáním P13 Sig E7 LAMP IL-12 byla díky přítomnosti IL-12 výrazně inhibována.

Hledali jsme tedy jinou možnost jak uplatnit pozitivní vliv IL-12 na imunitní odpověď Th1 proti nádorovému antigenu E7. Možný způsob se nám projevil při jiném způsobu podání, a to po imunizaci myšími dendritickými buňkami (DB) infikovanými rVV vakcínou. Z pokusů *in vivo* vyplývá, že dendritické buňky mají adjuvantní účinek na obě jednoduché rekombinanty P13 SigE7LAMP a MVA SigE7LAMP, avšak koexprese IL-12 u obou virů efekt DB významně snižuje.

LITERATURA

1. Lin K. Y., Guarnieri F. G., Staveley-O'Carroll K. F., Levitsky H. I., August J. T., Pardoll D. M., Wu T. C.: *Cancer Res.* 56, 21 (1996).
2. Chen B., Timiryasova T. M., Andres M. L., Kajioka E. H., Dutta-Roy R., Gridley D. S., Fodor I.: *Cancer Gene Ther.* Nov. 7, 1437 (2000).

REDUKČNÍ LÁTKA DITHIOTHREITOL USNADŇUJE AKTIVACI VANILOIDNÍHO RECEPTORU TRPV1

K. SUŠÁNKOVÁ, A. LYFENKO, V. VLACHOVÁ,
J. TEISINGER a L. VYKLICKÝ

Oddělení buněčné neurofyziologie, Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha e-mail: susinka@biomed.cas.cz

Vaniloidní receptor (TRPV1) je u savců specificky exprimován na membránách malých neuronů zadních kořenů míšních, kde se podílí na přenosu bolestivých podnětů. TRPV1 je aktivován nejen chemicky, kapsaicinem ($\text{EC}_{50} \sim 0,3 \mu\text{M}$)

a slabými kyselinami (pH 5,0–5,5), ale také fyzikálně-bolestivým teplem (43–52 °C). Dosud není znám mechanismus, kterým bolestivé stimuly vyvolávají strukturální změny receptoru vedoucí k jeho aktivaci. Existence tří extracelulárních cysteinových zbytků v pozicích 616, 621 a 634 v oblasti kličky póru TRPV1 nás přivedla k otázce, zda a do jaké míry je aktivita TRPV1 modulována změnou redox stavu SH skupin.

Zjistili jsme, že redukční látka DL-dithiothreitol výrazně zvyšuje membránovou odpověď vyvolanou bolestivým teplem a kapsaicinem (1 µM) jak u populace malých neuronů ganglií zadních kořenů míšních (<20 µm) izolovaných z potkana, tak u buněk tkáňových kultur HEK293T transfekovaných genem TRPV1. Účinek DTT je koncentračně závislý a plně reverzibilní. Aktivita rekombinantního receptoru TRPV1 je v přítomnosti 2 mM DTT statisticky významně zvýšena ($9,1 \pm 5,8 \times$ při 25 °C a $1,5 \pm 0,2 \times$ při 45 °C; $n = 19$).

Za účelem identifikace cysteinového zbytku, který se uplatňuje v tomto jevu, byly připraveny konstrukty genu TRPV1, kde je vždy jeden cysteinový zbytek nahrazen za neutrální zbytek glycinový.

Poměr volných –SH skupin a disulfidických můstků cysteinových zbytků TRPV1 významně ovlivňuje citlivost primárních nociceptorů k algogenům, a lze tedy předpokládat, že opačný účinek – oxidace TRPV1 – by mohl představovat možný terapeutický prostředek k léčbě některých bolestivých stavů u lidí.

Práce vznikla za podpory grantu GA ČR 305/03/082.

VÝVOJ ELISA TESTU PRO STANOVENÍ PROGESTERONU V MLÉCE

J. SWACZYNOVÁ, R. SIMERSKÝ a M. STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, ÚEB Akademie věd České republiky a Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc

Progesteron patří mezi pohlavní hormony steroidní povahy a je produkován cyklujícími nebo gravidním žlutým tělískem. U krav se progesteron podílí na zachování březosti a zabraňuje předčasným děložním stahům. Pomocí určení koncentrace progesteronu v kravském mléce nebo krevním séru lze snadno určit, v jaké fázi pohlavního cyklu se plemence nachází a upřesnit tak dobu nejvhodnější k její inseminaci.

V naší laboratoři byly vyvinuty polyklonální protilátky (M1, M4, P3) proti progesteronu. Antiséra byla získána imunizací králíků konjugátem 11 α -hydroxyprogesteron hemisukcinátu s hovězím sérovým albuminem (BSA). Tento konjugát byl připraven metodou směsných anhydridů. K přípravě enzymaticky značeného antigenu (11 α -hydroxyprogesteron hemisukcinát-peroxidasa) byla použita metoda aktivovaného esteru. Opakovanou imunizací králíků byla získána pozitivní antiséra, ze kterých byly vyizolovány aktivní protilátky srážením (NH₄)₂SO₄ a následnou dialýzou. Charakteristiky polyklonálních protilátek byly studovány na základě kompetitivní enzymové imunoanalýzy (ELISA). Specifita protilátek byla studována pomocí křížových reaktivit s příbuznými steroidními látkami. Hodnoty křížových reaktivit se pohybují v rozmezí 0,02–38,1 % (19 – norprogesteron).

ELISA testem s využitím protilátek M1 byly následně úspěšně studovány vzorky mléka (vzorky byly odebírány z tzv. celkového nádoje). Z výsledků vyplývá, že tento ELISA test je vhodný k popisu průběhu reprodukčního cyklu u krav (koncentrace progesteronu se pohybuje v rozmezí 15–40 ng.ml⁻¹ mléka). K popisu jednotlivých fází estrálního cyklu (koncentrace progesteronu se pohybuje mezi 0,5–20 ng.ml⁻¹ mléka) je sestavený ELISA test zatím málo citlivý. Zvýšení citlivosti testu předpokládáme zavedením zesilovacího systému, založeného na vazebné interakci mezi biotinizovaným 11 α -hydroxyprogesteron hemisukcinátem a enzymaticky značeným avidinem. Na této problematice v současnosti usilovně pracujeme.

PŘÍSPĚVEK K NOVÝM ANORGANICKÝM HETEROCYKICKÝM SLOUČENINÁM FOSFAZENOVÉHO TYPU

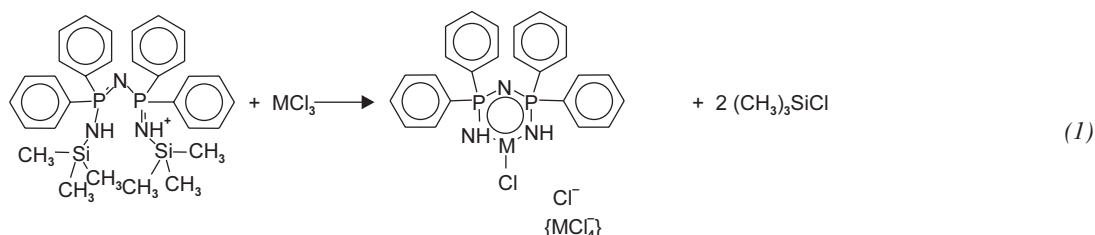
JAN TARABA a ZDIRAD ŽÁK

*Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: taraba@chemi.muni.cz*

Anorganickým heterocyklickým sloučeninám je zvláště pak v poslední době, věnována značná pozornost, nejen kvůli možnosti průzkumu vztahu vazebných možností a molekulové struktury, ale i stále častější využívání heterocyklických sloučenin, obsahujících kovy i nekovy, v praxi. Možnosti využití jsou např. pokovování ve vakuu, homogenní katalýza, využití biologické aktivity (zemědělské ochranné prostředky, léčiva, selektivní jedy) atd.

V odborné literatuře jsou uváděny obecné trendy přípravy 6-ti členných cyklických sloučenin fosfazenového typu obsahující ve své struktuře heteroatom. Na počátku příprav 6-ti členných heterocyklů byl objev látky „Imidobis(aminodifenylfosforan) chlorid“ (Ph₂PNH₂)₂NCl (cit.¹). Z této publikace vychází celá řada prací zabývajících se syntézou a strukturou 6-ti členných heterocyklů. Za všechny uvedme přípravu heterocyklů^{2,3} přechodných kovů (W, V, Re ...) všechny reakce v pracích popisované jsou reakce mezi halogenidy přechodných kovů a (Ph₂PNH₂)₂NCl (při reakci se uvolňuje HCl a reakce je většinou rovnovážná). Pokud jde o přípravu heterocyklů s nepřechodnými kovy i nekovy uvedeme práci⁴ (heterocykly s Al, Ga a In), ve které autoři volí postup přípravy přes sloučeniny typu MMe₃ (M = Al, Ga, In) reakcí s HN(PR₂NHSiMe₃)₂ (R = Ph, NMe₂) a odštěpení molekuly methanu. Nevýhodou tohoto postupu je obtížné získávání reaktantů a malá výtěžnost reakce.

V našem základním výzkumu této problematiky jsme zvolili pro přípravu nových heterocyklů reakci halogenidů nepřechodných kovů i nekovů s *N,N'*-bistrimetylsilyl-tetrafenyldifosfazen chloridem N(Ph₂PNHSiMe₃)₂Cl. Výhodou námi zvoleného syntetického postupu je vysoká výtěžnost reakcí a čistota získaných produktů. Z reakčního systému odpadá trimethylchlorosilan jako vedlejší produkt a zároveň zde slouží jako rozpouštědlo. Tento syntetický postup se nám jeví jako nejvýhodnější a s jeho pomocí se nám podařilo připravit několik nových 6-ti členných anorganických heterocyklic-



kých sloučenin. Probíhající chemická reakce se dá zapsat obecnou rovnicí (I).

LITERATURA

1. Cox J. W.: Chem. Commun. 1969, 205.
2. Roesky H. W., Katti V.: Angew. Chem. 98, 447 (1986).
3. Katti V., Roesky H. W.: Inorg. Chem. 26, 4032 (1987).
4. Roesky H. W., Heine A.: Z. Naturforsch., B: Chem. Sci. 48, 43 (1993).

SYNTEZA HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH HETEROCYKLŮ: NOVÝ ZPŮSOB PŘÍPRAVY NERACEMICKÝCH AZAHELICENŮ¹

FILIP TEPLÝ, IRENA G. STARÁ*,
IVO STARÝ* a DAVID ŠAMAN

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: filip.teply@uochb.cas.cz

Renesance zájmu o helicity v posledních 10 letech souvisí s rozvojem jejich syntetické metodologie a se slibnými aplikacemi těchto látek v oblasti enantiosektivní katalýzy, molekulového rozpoznávání a materiálové chemie. Další možné využití naznačují teoretické studie, podle nichž by se helicity měly chovat jako miniaturní pružiny a měly by vykazovat významné vodivostní vlastnosti. Vedle klasické fotochemické

přípravy helicenů, která je v řadě případů nevýhodná, se v poslední době objevily dvě metody, jejichž potenciál dokumentuje řada úspěšných syntéz helicenů a jejich derivátů. Přes tento významný pokrok neexistovala až do nedávné doby spolehlivá metoda přípravy azahelicenů, kterých bylo s velkými obtížemi připraveno v minulosti jen několik derivátů v racemické formě^{2,3}. Koordinace tranzitních kovů k „pyridinovému“ dusíku spolu s možnou strukturní rozmanitostí azahelicenového skeletu předurčuje tyto látky k řadě aplikací v asymetrické syntéze a supramolekulární chemii.

Zjistili jsme, že námi vyvinutý způsob přípravy helicenů, který je založen na [2+2+2] cykloisomeraci aromatických trienů za katalýzy tranzitními kovy⁴⁻⁶ lze s výhodou použít i při syntéze azahelicenů a jejich derivátů. Tímto postupem, který je modulární, konvergentní a poskytuje dobré preparativní výtěžky, byly připraveny látky I a II. Je-li zavedeno centrum chiralidy do molekuly trienu, [2+2+2] cykloisomerace probíhá s vysokou diastereoselektivitou (III→IV). Otevírá se tak schůdný syntetický přístup k azahelicenům a jejich derivátům v neracemické formě.

LITERATURA

1. Podporováno GA ČR (reg. č. 203/02/0248) a ÚOCHB AV ČR (výzkumný projekt č. Z4 055 905).
2. Martin R. H., Deblecker M.: Tetrahedron Lett. 10, 3597 (1969).
3. Staab H. A., Diehm M., Krieger C.: Tetrahedron Lett. 35, 8357 (1994).
4. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: J. Org. Chem. 63, 4046 (1998).
5. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Vyskočil Š., Šaman D.: Tetrahedron Lett. 40, 1993 (1999).
6. Teplý F., Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Šaman D., Rulíšek L., Fiedler P.: J. Am. Chem. Soc. 124, 9175 (2002).

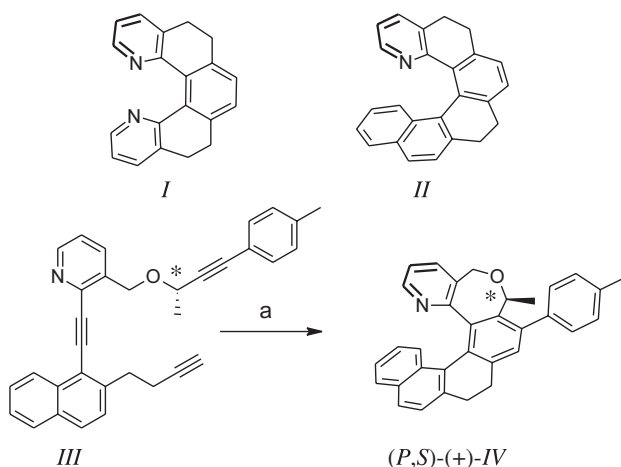
EFFECT OF EXTRACTS FROM *Smallanthus sonchifolius* LEAVES ON RAT HEPATOCYTES AND HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

KATEŘINA VALENTOVÁ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

e-mail: kata.valentova@email.cz

Yacon, *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) is a native Andean plant, cultivated for its tubers throughout South Ame-



a: CpCo(CO)₂ (20 %), PPh₃ (40 %), dekan, 140°C, 1 h, halogenová lampa, 54 %

rica where they are commonly used by diabetics and persons suffering from digestive problems. 1,2- β -Oigofructans, its main saccharides, are used as prebiotics to correct the intestinal flora and absorption of elements such as calcium, magnesium and iron. Positive physiological properties have also been attributed to yacon leaves in Brazil in particular, where the dried leaves are used to prepare a medicinal tea. Recently, we have reported antioxidant activity of an extract from *S. sonchifolius* leaves in relation to its phenolic content¹. In this contribution, we describe:

1. The effect of organic (I, II) and aqueous (III, IV) extracts from *S. sonchifolius* leaves on rat hepatocytes isolated by two-step collagenase perfusion of the liver. Protective effect of the extracts against oxidative injury (*tert*.butylhydroperoxide, 0.5 mM, 1.5 h and allyl alcohol, 0.2 mM, 4 h) of hepatocyte primary cultures was assessed by: cell viability (MTT test), the level of released LDH (test of membrane integrity) and lipoperoxidation products reacting with thiobarbituric acid (TBARS). The effect on glucose production from different precursors (lactate/pyruvate, dihydroxyacetone and aspartate) was evaluated in suspensions of hepatocytes isolated from 24 h starved rats in comparison with metformin (1,1-dimethylbiguanide). We demonstrated a dose-dependent protective effect in concentrations ranging from 1 to 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ and a significant reduction of gluconeogenesis in the presence of 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ of an aqueous extract IV. Ongoing studies to evaluate the effects of extracts on glycogenolysis *in vitro* as well as *in vivo* are in progress.

2. The effect of extracts (I–IV) on hydrogen peroxide (100 mM, 1 h) induced oxidative damage of human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC). The extracts I and II displayed protective effects against oxidative damage of the HUVEC at 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ on MTT test and on level of apoptosis related enzymes.

This work was supported by the grants GA CR 303/01/0171 and MSM 151100003.

REFERENCES

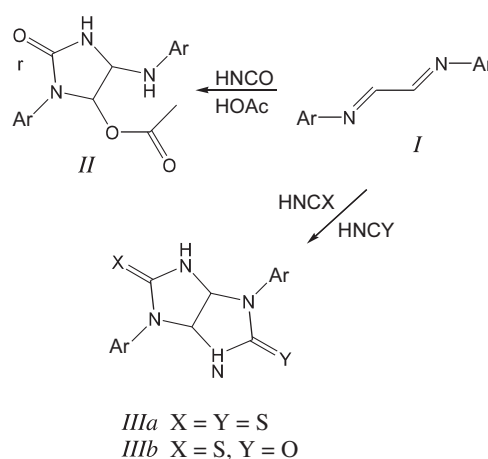
1. Valentová K., Cvak L., Muck A., Ulrichová J., Šimánek V.: Eur. J. Nutr. 42, (2003), in press.

CRISS-CROSS CYKLOADICE NA AROMATICKÝCH GLYOXALIMINECH

JIŘÍ VERNER a MILAN POTÁČEK

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: jverner@chemi.muni.cz*

V současné době jsou celkem dobře popsány criss-cross¹ cykloadice na 2,3-diazabuta-1,3-dienech (azinech). Cykloadice na 1,4-diazabuta-1,3-dienech (glyoxaliminech, I) jsou naproti tomu celkem vzácné. Sakamoto² a spol. popsali cykloadici aryl- a benzoylisokyanátů s 1,1'-biisochinolinoly a Takahashi³ studoval criss-cross cykloadice glyoxaliminů s trimethylsilylisothiokyanátem, kde produktem jsou perhy-



droimidazo[4,5-*d*]imidazol-2,5-dithionu (thioglykolurily, IIIa).

Thioglykolurily IIIa jsou klasickými metodami obtížně získatelné. Podle některých prací lze získat jednoduché thioglykolurily IIIa kondenzací 1,2-dikarbonylových sloučenin s thiomocovinou v alkalickém prostředí⁴. Některé práce ovšem uvádějí vznik diiminodithiadiazabicyklooktanu, jako produktu reakce thiomocoviny s glyoxalem⁵. V každém případě jsou thioglykolurily dostupné z glykolurilů sulfurací Lawessonovým činidlem (P_2S_5) (cit.⁶).

Při studiu criss-cross cykloadic na glyoxaliminech⁷ jsme pozorovali zvláštní chování aromatického glyoxaliminu (4-methoxyfenyl) ve směsi KNCS a KNCO v kyselině octové. Zjistili jsme, že v tomto případě vzniká prakticky čistý nesymetrický 1,4-disubstituovaný-5-thioxoperhydroimidazo[4,5-*d*]imidazol-2-on (monothioglykoluril, IIIb). Tento fakt nás přiměl k prozkoumání reaktivity a chování dalších aromatických glyoxaliminů, což je obsahem tohoto příspěvku. Zjistili jsme, že criss-cross cykloadice HNCS na aromatických glyoxaliminech vedou obecně k thioglykolurilům IIIa a ve směsi HNCO a HNCS vznikají čisté nesymetrické criss-cross produkty monothioglykolurily IIIb. V ojedinělém případě jsme pozorovali vznik aduktu meziproductu s kyselinou octovou II, což potvrzuje představu o průběhu reakce jako sledu dvou bimolekulárních reakcí.

Metoda criss-cross cykloadice HCNS umožňuje levně a pohodlně připravovat substituované glykolurily. Pro přípravu monothioglykolurilů je tato nová metoda jediná známá.

LITERATURA

1. Bailey J. R., Moore N. H.: J. Am. Chem. Soc. 39, 279 (1917).
2. Sakamoto M., Tomimatsu Y., Miyazawa K., Tokoro K.: Yakugaku Zasshi. 92, 1462 (1972).
3. Takahashi M., Miyadai S.: Heterocycles 31, 883 (1990).
4. Broan C. J., Butler A. R., Reed D., Sadler I. H.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 7, 731 (1989).
5. Long Q., Hong G., Zuo G., Ding H.: Youji Huaxue 3, 170 (1982); Chem. Abstr. 96, 562876 (1982).
6. Cow C. C., Harrison P. H. M.: J. Org. Chem. 62, 8834 (1997).
7. Verner J., Taraba J., Potáček M.: Tetrahedron Lett. 43, 4833 (2002).

DETERMINATION OF pK_R^+ CONSTANTS AND WATER-SOLUBILITY OF ALKALOIDS SANGUINARINE AND CHELERYTHRINE BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

MARKÉTA VLČKOVÁ^{a,c}, PETR BARTÁK^b,
and RADIM VESPALEC^c

^aDepartment of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno,

^bDepartment of Analytical Chemistry, Palacký University, Třída svobody 8, 771 46 Olomouc, ^cInstitute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Veveří 97, 611 42 Brno

Sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE) are quarternary benzo[c]phenanthridine alkaloids displaying a wide spectrum of biological activities. At present, plant extracts containing these alkaloids are used in toothpastes and oral rinses for their antiplaque effect. However, both alkaloids exhibit adverse side effects in addition to their desired pharmacological activity. The molecular basis of some of the negative effects has not been sufficiently explained so far. The investigation of interactions of these alkaloids with biological molecules at physiological conditions may considerably contribute to the sought explanation.

Both alkaloids occur at so called physiological pH 7.4 in two chemically different forms linked together by the protolytic equilibrium. However, published pK_R^+ values¹ for this equilibrium vary in an unacceptably wide range indicating their dependence on experimental conditions. Moreover, the uncharged forms of both alkaloids are water-insoluble¹ but their solubility in aqueous solutions has not been determined yet. However, both pK_R^+ values of SA and CHE relevant to the actual conditions and the solubility of their uncharged forms are necessary for the interpretation of any experiment with these alkaloids performed at physiological conditions.

Capillary zone electrophoresis as a technique chosen for the investigation of interactions of the alkaloids with biological molecules was used for the determination of pK_R^+ constants of SA and CHE valid at conditions of interaction measurements and for the determination of the solubility of their uncharged forms. Moreover, the influence of the composition of the background electrolyte and of its ionic strength on pK_R^+ values was investigated.

pK_R^+ constants of SA and CHE valid at ionic strength of 30 mM are 8.14 ± 0.08 and 9.15 ± 0.09 , respectively. The constants were found to be dependent on the ionic strength of the background electrolyte but independent of its composition. The solubility of the uncharged form of SA and CHE is 1.76 ± 0.24 mM and 0.78 ± 0.06 mM, respectively. The total solubility of the alkaloids at any pH may be calculated using the solubility of the uncharged form and pK_R^+ constants of SA and CHE because the total solubility is the sum of concentration of the dissolved uncharged form and of the charged form, which is in equilibrium with it.

The determination of the solubility using capillary zone electrophoresis is reported here for the first time.

REFERENCES

1. Dostál J., Potáček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 55, 2840 (1990).

(2S)-2-CHLORO-2-FLUOROETHANOYL ISOKYANÁT JAKO CHIRÁLNÍ DERIVATIZAČNÍ ČINIDLO

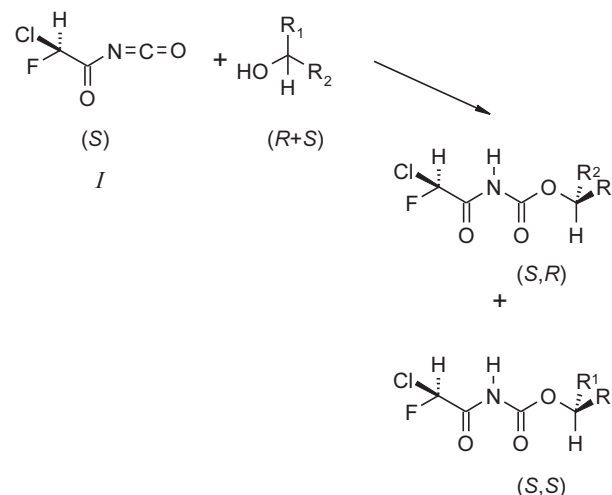
PETR VODIČKA, LUDVÍK STREINZ,
MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ, BOHUMÍR KOUTEK
a JAN ONDRÁČEK

Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Inspirování trichloroacetyl isokyanátem (TAI), který se široce používá při NMR analýzách alkoholů, jsme připravili (2S)-2-chloro-2-fluoroethanoyl isokyanát (*I*); jeho chirální analog.

Acylisokyanát *I*, rychlou reakcí s různými chirálními sekundárními alkoholy poskytuje diastereomerní karbamáty jejich stereochemii jsme korelovali s $\Delta\delta$ hodnotami ¹H NMR spekter. Analýzou zjištěných $\Delta\delta$ v posunech NMR spekter ($\Delta\delta = \delta(R) - \delta(S)$) jsme odvodili pravděpodobnou konformaci vznikajících produktů, která lze využít k případnému určení absolutní konfigurace analyzovaného chirálního alkoholu. Planární konformace byla potvrzena X-Ray analýzou.

V případě směsi chirálních alkoholů je zastoupení jednotlivých složek snadno zjistitelné díky rozdílu posunů ($\Delta\delta$) na CHFCI vodíku, který má signál v oblasti 6–7 ppm, kde se většinou jiné signály neobjevují.



Nejlépeších výsledků bylo dosaženo u aromatických alkoholů díky jejich silnému anisotropnímu efektu. Naopak, u jednoduchých alifatických alkoholů není patrný téměř žádných rozdílů. Do budoucna proto plánujeme přípravu nových chirálních derivátů acylisokyanátu *I*, které budou stabilnější a budou obsahovat skupinu způsobující silnější anisotropní efekt pro větší rozdíly v NMR spektrech.

SANGUINARINE EFFECT ON OXIDATIVE BURST IN DMSO-DIFFERENTIATED CELLS PROCEEDS VIA AFFECTING THE NADPH OXIDASE

JIŘÍ VRBA and MARTIN MODRIANSKÝ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Sanguinarine (SA), a member of the benzophenanthridine isoquinoline alkaloids, has been shown to possess antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. We examined the effects of SA on oxidative burst in DMSO-differentiated HL-60 cells, an excellent model for studying oxidative burst. SA inhibited both *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) and phorbol myristoyl acetate (PMA)-induced oxidative burst with very similar IC₅₀ of 1.5 μ M and 1.8 μ M, respectively. Although SA was shown to scavenge superoxide with IC₅₀ of 10 μ M (ref.¹), in our view the inhibition of oxidative burst cannot be ascribed to antioxidant properties of SA. Here we demonstrate that the IC₅₀ for reactive oxygen species (ROS) scavenging by SA in a non-cellular generating system is greater than 100 μ M. TROLOX, a water-soluble vitamin E analog, had IC₅₀ of 3 μ M in the same system. Moreover, cyclic voltammetry measurements show that SA redox activity is poor, with peak anodic potential at 700 mV, as compared to TROLOX with peak anodic potential at 200 mV. On the other hand, TROLOX, when used in cell suspension, was much poorer inhibitor of oxidative burst than SA. In addition, the ability of SA to inhibit oxidative burst was impaired by 5 minute incubation of the alkaloid with 50-fold higher concentration of dithiotreitol. Therefore we hypothesized that SA affects the NADPH oxidase. Unfortunately, direct effect of SA on NADPH oxidase activity in the post-granular fraction of disrupted cells cannot be tested due to SDS interference with SA activity. The presence of SDS is required for spontaneous assembly of the NADPH oxidase complex in a non-cellular system. Consequently, we used a homologous enzyme, the NADPH:cytochrome P450 reductase from microsomes to estimate the ability of SA to inhibit electron transfer mediated by a flavocytochrome. SA inhibited NADPH:CYP reductase with IC₅₀ of 18 μ M. We conclude the SA inhibition of oxidative burst is in part caused by SA affecting the activity of NADPH oxidase directly and in part by preventing the formation of NADPH oxidase protein complex.

This research was supported by MSM grant MSM 115100003.

REFERENCES

1. Ferrándiz M. L., Montesinos C., Ubeda A., Manez S., Payá M., Alcaraz M. J.: *Planta Med.* 57, A49 (1991).

VYHLEDÁVÁNÍ PROMOTORŮ *Corynebacterium glutamicum* REGULOVATELNÝCH VNĚJŠÍMI STRESOVÝMI FAKTORY

MARTINA ZEMANOVÁ, MIROSLAV PÁTEK a JAN NEŠVERA

*Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
e-mail: zemanovm@biomed.cas.cz*

Corynebacterium glutamicum je grampozitivní nesporující bakterie využívaná k průmyslové produkci aminokyselin. V posledních letech značně vzrostla znalost o uspořádání genů účastnících se biosyntézy různých aminokyselin, stále se však příliš mnoho neví o molekulárních signálech regulujících expresi těchto genů. Pro poznání mechanismů regulace exprese genů na transkripční úrovni má klíčový význam znalost struktury a funkce iniciačních signálů (promotorů). Promotory, které mohou být během fermentace snadno „zapnuty“ nebo „vypnuty“ působením vnějších faktorů, mohou zajistit regulované zvýšení exprese vybraných genů. Proto byly vyhledávány promotory *C. glutamicum*, které reagují na vnější stresové faktory (zvýšenou teplotu a snížené pH). chromozomová DNA kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 byla štěpena restriční endonukleasou Sau3AI a byly izolovány vzniklé fragmenty ve velikostním rozmezí 150–500 bp. Směs těchto fragmentů byla klonována do podvojného promoter-probe vektoru pET2, replikujícího se v *E. coli* a *C. glutamicum* a nesoucího reportérový gen *cat*, kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu. Směsí derivátů plasmidu pET2 obsahujících vložené fragmenty byly transformovány buňky *E. coli*. Tímto způsobem byla připravena knihovna potenciálních promotorů *C. glutamicum* v *E. coli* tvořená zhruba 10 000 klonů. Kmen *C. glutamicum* R127, postrádající restričně-modifikační systém, byl transformován plazmidovou DNA izolovanou z této knihovny a transformanty byly selektovány na půdě s chloramfenikolem při různé teplotě (30 °C a 37 °C) a při různých hodnotách pH (4,5–6). Byly získány tři klonů obsahující promotory *C. glutamicum* se zvýšenou aktivitou při vyšší teplotě (37 °C) a 2 klonů s promotory se zvýšenou aktivitou při nižším pH (4,5–5). Jeden z promotorů aktivovaných zvýšenou teplotou byl po sekvenování přesně lokalizován na mapě chromozomu *C. glutamicum* před genem *phoH*, který kóduje ATPasu indukovanou hladověním na fosfát.

Dále byly na základě úplné sekvence chromozomu *C. glutamicum* metodou PCR připraveny fragmenty DNA obsahující promotory genů *clpB* a *clpC*, kódující heat shock proteiny s chaperonovou aktivitou a promotoru genu *sigE*, kódujícího podjednotku RNA polymerasy sigmaE indukovanou působením vnějších stresových faktorů.

Lze předpokládat, že aktivita uvedených promotorů bude výrazně stimulována působením zvýšené teploty, případně i působením dalších stresových faktorů. Bude detailně analyzována struktura a funkce uvedených promotorů, případně budou jejich vlastnosti cíleně modifikovány metodami genového inženýrství.

RECEPTORY ANIONŮ ZALOŽENÉ NA DERIVÁTECH THIALCALIX[4]ARENU

PETRA ZLATUŠKOVÁ, VERONIKA MICHLOVÁ,
IVAN STIBOR a PAVEL LHOTÁK

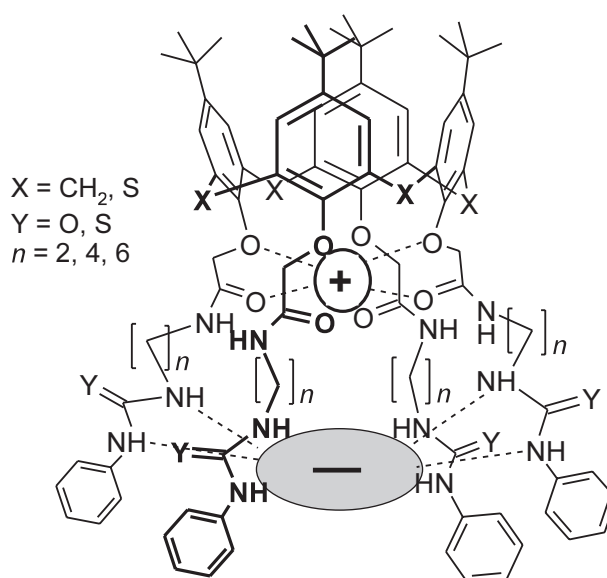
Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technolo-
gická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Petra.Zlatuskova@vscht.cz

Calixareny, makrocyclické ligandy vznikající bazickou kondenzací 4-*tert*.butylfenolu s formaldehydem, se v poslední době řadí mezi nejběžněji používané molekuly pro syntézu receptorů iontů i neutrálních molekul. Teprve před několika lety byl připraven thiacalix[4]aren, sloučenina lišící se od klasického calix[4]arenu nejen reaktivitou, ale i velikostí a tvarem kavity.

Předkládaná práce představuje první syntézu receptorů aniontů založených na thiacalix[4]arenovém skeletu. Je zde popisována příprava série látek, ve kterých je modifikován tvar a druh vazebného místa pro anion. Tyto sloučeniny obsahují také vazebné místo pro kation a mohou tedy být receptorem celého iontového páru. Schopnost těchto látek vázat chloridový anion a vliv navázání kationtu na komplexaci aniontu byl zkoumán pomocí NMR spektroskopie.

LITERATURA

1. Kumagai H., Hasegawa H., Miyanari S., Sugawa Y., Sato Y., Hori T., Ueda S., Kamiyama H., Miyano S.: *Tetrahedron Lett.* 38, 3971 (1997).



2. Lhoták P., Šťastný V., Zlatušková P., Stibor I., Michlová V., Tkadlecová M., Havlíček J., Sýkora J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 757 (2000).
3. Iki N., Morohashi N., Narumi F., Fujimoto T., Suzuki T., Miyano S.: *Tetrahedron Lett.* 40, 7337 (1999).
4. Jentgens C., Bienz S., Hesse M.: *Helv. Chem. Acta* 80, 1133 (1997).