

*Masarykova univerzita v Brně – Přírodovědecká fakulta
Akademie věd České republiky – Biofyzikální ústav
Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii*

pod záštitou

rektora Masarykovy university prof. RNDr. Jiřího Zlatušky, CSc.
děkana Přírodovědecké fakulty MU prof. RNDr. Jana Slováka, DrSc.
ředitelky Biofyzikálního ústav Akademie věd České republiky RNDr. Jany Šlotové, CSc.

VII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů

Sborník příspěvků



29. ledna 2003

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

PŘEDEŠLÁ PRACOVNÍ SETKÁNÍ BIOCHEMIKŮ A MOLEKULÁRNÍCH BIOLOGŮ

14. července 1997 ; 21. ledna 1998; 3. února 1999; 9. února 2000; 14. února 2001; 7. února 2002

Vážení přátelé,

dovolujeme si Vás přivítat na sedmém pracovním setkání biochemiků a molekulárních biologů v Brně.

Doufáme, že se nám společně podařilo vytvořit program, ve kterém si každý z nás najde spoustu nových a zajímavých informací z ostatních zúčastněných pracovišť.

Přejeme Vám, abyste z Brna odjízděli spokojeni a my Vás opět mohli přivítat při následujících příležitostech.

V neposlední řadě bychom chtěli poděkovat také firmám, bez jejichž účasti bychom nemohli takové setkání uskutečnit.

Vaši organizátoři

Michaela Wimmerová, Libuše Trnková, René Kizek, Petr Beneš,
Petr Zbořil a Pavla Boublíková

Masarykova univerzita v Brně
Kotlářská 2
611 37 Brno
Tel: 541129406
Fax: 541129623
E-mail: michaw@chemi.muni.cz

Obsah sborníku

Přednášky	3 – 15
Sekce mladých	16 – 38
Postery	39 – 68
Autorský rejstřík	69 – 71
Prezentace firem	72 – 80

Přednášky

CHICKEN EGG AS AN ABUNDANT SOURCE OF HIGHLY SPECIFIC ANTIBODIES

Petr Hodek, Tomáš Koblas, Helena Rýdlová, Václav Martínek, Marie Stiborová
*Charles University in Prague, Faculty of Nature Science, Department of Biochemistry,
Hlavova 2030, 128 43 Prague 2*

The chicken immune system has been studied for many years and these studies have contributed substantially to our understanding of the fundamental concepts of immunology and the development of different immunoglobulin classes. It is thus surprising that only a small fraction of the antibodies presently used in laboratories are of avian origin. A laying hen produces more yolk antibodies than a rabbit can produce during the same time period, and the animal care costs are lower for the chicken compared to the rabbit.

In addition, chicken antibodies (IgY) offer many advantages to the traditional mammalian antibodies when used for the detection of mammalian antigen. Due to the evolutionary difference chicken IgY will react with more epitopes on a mammalian antigen, which will give an amplification of the signal. Chicken antibodies can also be used to avoid interference in immunological assays caused by the human complement system, rheumatoid factors, human anti-mouse IgG antibodies or human and bacterial Fc-receptors. The antibodies can be purified in large amounts from egg yolk, making laying hens highly efficient producers of polyclonal antibodies.

In this lecture, we report on the fast and efficient method for generation and affinity purification of IgY. The IgY was raised against the rat recombinant CYP 1A1, an enzyme responsible for carcinogen activation in a human body. Moreover, the application of these antibodies for the enzyme detection in human liver microsomal samples using Western blotting will be discussed.

This study was supported by Grant MSM-113100001 from Ministry of Education of the Czech Republic and GACR 523/01/0840.

COMPARATIVE GENOMICS OF PATHOGENIC *TREPONEMA PALLIDUM* SUBSPECIES KOMPARATIVNÍ GENOMIKA PATOGENNÍCH PODDRUHŮ *TREPONEMA* *PALLIDUM*

Petra Matějková¹, David Šmajš¹, Steven J. Norris² a George M. Weinstock³

¹*Biologický ústav LF MU v Brně, Joštova 10, Brno 662 43, Česká republika*

²*Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas, Houston Medical School, 6431 Fannin Street, Houston TX 77030, USA*

³*Human 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 *Treponema 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, 25 genes (13 with stronger and 6 with weaker signal in *pertenue* strains and 6 control genes with similar signal in both subspecies examined) were selected and sequenced. Altogether, 24083 nucleotides (2.12% 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 (SNP) were identified: 3 SNPs in Gauthier strain, 14 in Samoan D and 15 SNPs in CDC-2. Ten (out of 15) SNPs cause amino acid changes. SNPs common for all *pertenue* 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.

ROZLIŠENÍ *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO POMOCÍ PROTEINOVÉHO
PROFILU A FAME PROFILU
DIFFERENTIATION OF *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO USING WHOLE-
CELL PROTEIN PROFIL AND FAME PROFIL

L. Čechová⁽¹⁾, M. Němec⁽¹⁾, E. Durnová⁽²⁾, J. Halouzka⁽³⁾

(1) Katedra mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno, Tvrděho
14, 602 00 Brno

(2) Krajská hygienická stanice Ostrava, Partyzánské náměstí 7,

(3) Ústav biologie obratlovců AVČR, Laboratoř medicínské zoologie, Klášterní 2, Valtice

Správná identifikace bakterií *Borrelia burgdorferi* sensu lato je nutná pro rychlou diagnostiku multisystémového onemocnění lymfskou boreliózou. Komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato se dělí do několika druhů, z nichž jsou s lymfskou boreliózou prokazatelně spojeny tři druhy (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* a *B. garinii*).

V této práci byly sledovány rozdíly mezi 10 kmeny borelií, mezi kterými byly zastoupeny druhy způsobující lymfskou boreliózu i další druhy komplexu *B. burgdorferi* s. l. (*B. valaisiana*) a dále pak dosud blíže neurčené kmeny borelií izolované z hlodavců a členovců.

Proteinový profil bakterií byl studován pomocí polyakrylamidové elektroforézy (SDS PAGE) na 12% separačním gelu a následně byly proteiny srovnány pomocí software (Bio-1D) na základě svých molekulových hmotností a intenzity jednotlivých bandů. Klusterovou analýzou, získanou pomocí metody UPGMA, bylo zjištěno, že všechny studované kmeny byly zařazeny do jedné skupiny s podobností $r \geq 0,7$. U sledovaných kmenů borelií se největší počet proteinů nacházel v oblasti mezi 18 a 60 kDa.

Analýza metylesterů mastných kyselin (fatty acid methyl ester, FAME) bakterií je běžně užívanou chemotaxonomickou metodou. Mastné kyseliny se významně podílejí na patogenezi některých bakteriálních onemocnění. Výhodou této metody je, že profil mastných kyselin bakterií je stabilním fenotypovým znakem, jestliže jsou bakterie kultivovány za standardních podmínek. Metabolismus mastných kyselin není u borelií kontrolován plazmidy, přítomnost určitých kyselin by proto měla korelovat s taxonomickou identifikací daného druhu. Analýza

byla provedena pomocí plynové chromatografie ve spojení s Mikrobiálním identifikačním systémem (Sherlock). U všech sledovaných kmenů borelií byly zastoupeny mastné kyseliny s počtem uhlíků 12 až 18. Kvantitativně byly nejvíce zastoupeny kyselina palmitová (C 16:0), kyselina olejová [C 18:1(9c)] a kyselina stearová (C 18:0).

Závěrem lze říci, že analýzy FAME profilu a profilu celobuněčných proteinů, získaných pomocí SDS PAGE, mohou pomoci k dalšímu studiu bakterií *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

CESTA OD POSTTRANSKRIPČNÍHO K TRANSKRIPČNÍMU UMLČENÍ
ROSTLINNÉHO TRANSGENU JE DOPROVÁZENA METYLACÍ *DE NOVO*
PROMOTORU
SWITCH FROM POSTTRANSCRIPTIONAL TO TRANSCRIPTIONAL SILENCING IS
ASSOCIATED WITH *DE NOVO* METHYLATION OF A PROMOTOR IN PLANT
TRANSGENE

Miloslava Fojtová, Aleš Kovařík
Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno, 612 65

U rostlin mohou být geny umlčeny mechanismem transkripčním nebo posttranskripčním. Pro posttranskripční umlčení genu je charakteristická normální transkripční aktivita promotoru, nestabilita transkriptu a metylace DNA v transkribované oblasti ¹. Transkripčně umlčené geny mají inaktivní promotor a jejich DNA je metylovaná v oblasti promotoru ².

Transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* HeLo1 a HeLo2 nesoucí gen pro neomycinfosfotransferázu II (*nptII*) se výrazně liší v expresi transgenní DNA. HeLo2 nese jednu kopii transgenu (lokus 2) a obsah proteinu NPTII v extraktu z listů je až tisícinásobně vyšší ve srovnání s rostlinou HeLo1, která obsahuje dvě kopie transgenu vzájemně orientované jako obrácená repetice (lokus 1). Bylo prokázáno, že gen *nptII* je v linii HeLo1 posttranskripčně umlčen. Uspořádání transgenu jako obrácená repetice je výhodné pro umlčení tohoto genu a genů homologních ³. Pokud je jeden gen z této formace odstraněn, dojde často k uvolnění umlčení a poklesu metylace v centru repetice, což dokazuje schopnost palindromu spouštět metylaci DNA ⁴.

Zjistili jsme, že během dlouhodobé kultivace transgenního tabáku HeLo1 v kalusové kultuře (24 měsíců) došlo k významnému poklesu metylace cytosinů v asymetrickém kontextu v 3' transkribované části *nptII* genu, v dřívějších experimentech byla prokázána souvislost této metylace a umlčení transgenu ⁵. Současně byla pozorována metylace *de novo* na jeho 5' konci a dokonce i v oblasti 35S promotoru. Methylace transgenní DNA v kalusu HeLo2 se neměnila a pozorované metylační změny tedy nemají souvislost s ustanovením kalusové kultury, nýbrž s uspořádáním transgenní kazety v jednotlivých rostlinných liniích. Nový epigenetický obraz byl přenesen z kalusu i do regenerovaných rostlin. V epimutovaném kalusu a v regenerovaných rostlinách zůstávají hladiny „steady-state“ RNA a proteinového produktu transgenu na nízké úrovni, srovnatelné s původní posttranskripčně umlčenou rostlinou HeLo1. Metodou „run on“, která umožňuje měření *in vitro* transkripce, bylo zjištěno, že metylovaný promotor epimutovaných regenerantů je inaktivní. V tomto případě nebyl zjištěn žádný transkript, na rozdíl od původní rostliny HeLo1, která má hladinu primárního transkriptu srovnatelnou s neumlčeným transgenním tabákem HeLo2.

Výsledky vedou k závěru, že metylační změny transgenu navozené během dlouhodobé kultivace v tkáňové kultuře vedly ke změně typu umlčení transgenu z posttranskripčního na transkripční.

1. Vaucheret,H., Beclin,C., Fagard,M. J. Cell Sci., 114, 3083-3091, 2001.
2. Vaucheret,H.,Fagard,M. Trends Genet., 17, 29-35, 2001.
3. Selker,E.U. Cell, 97, 157-160, 1999.
4. De Buck S., Depicker,A. Mol Genet Genomics, 265, 1060-1068, 2001.
5. Kovařík,A., Van Houdt,H., Holý,A., Depicker,A. FEBS Lett., 467, 47-51, 2000.

Práce je financována granty GA ČR 521/01/P042 (M.F.) a 521/01/0037 (A.K.).

ROZPOZNÁNÍ STRUKTURY DNA NÁDOROVĚ SUPRESOROVÝM PROTEINEM p53.
 ÚLOHA JEHO C-TERMINÁLNÍ DOMÉNY.
 RECOGNITION OF DNA STRUCTURES BY TUMOUR SUPPRESSOR PROTEIN p53.
 ROLE OF THE PROTEIN C-TERMINAL DOMAIN.

Miroslav Fojta, Hana Pivoňková, Marie Brázdová, Petr Pečinka, Václav Brázda, Emil Paleček
Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, e-mail: fojta@ibp.cz

Nádorově supresorový protein p53 je znám jako významná regulační molekula, hrající úlohu v odpovědi buňky na stresové podmínky a chránící organismus před vznikem maligních nádorů. Dobře je popsána úloha aktivní formy p53 jako transkripčního aktivátoru dalších genů, účastnících se zastavení buněčného cyklu, oprav DNA, nebo spouštění apoptózy. Pro tuto roli je klíčová schopnost p53 vázat se na specifické sekvence (p53CON) v promotorových oblastech příslušných genů prostřednictvím své centrální domény (CD). Rovněž je obecně přijímáno, že k aktivaci samotného proteinu p53 dochází v důsledku jeho specifických posttranslačních modifikací (např. forforylací) v C-terminální doméně (CTD)¹. CTD p53 obsahuje oblast, která – pokud není modifikována – inhibuje schopnost proteinu p53 vázat se na p53CON (tzv. „latentní“ stav p53). Tato oblast se překrývá s bazickým místem, vzájemným DNA sekvenčně nespecificky². O mechanismus negativní regulace p53 prostřednictvím jeho CTD se vede spor mezi zastánci tzv. allosterického modelu a modelu sterického (interferenčního), založeného na představě, že „latentní“ p53 se nespecificky váže na genomovou DNA prostřednictvím CTD, což brání efektivní vazbě na p53CON; modifikace v CTD nespecifickou vazbu oslabí, čímž se p53 „aktivuje“².

Je rovněž známo, že protein p53 je schopen rozpoznávat určité strukturní motivy DNA, a to buď prostřednictvím CD (např. vlásenky, Hollidayovy spoje), nebo CTD (struktury spojené s poškozením DNA). Tyto aktivity se zdají být typické pro nemodifikovaný protein a někteří autoři soudí, že „latentní“ p53 by mohla hrát přímou (transkripčně nezávislou) úlohu při opravných procesech, rekombinaci nebo replikaci DNA³. Naše laboratoř v posledních letech přispěla k výzkumu DNA-vazebných aktivit p53 objevem vazby selektivní pro nadšroubovicovou (sc) DNA (SCS vazba). Ukázali jsme, že pro tento typ interakce je nezbytná přítomnost CTD (bazického DNA-vazebného místa) a schopnost proteinu oligomerizovat⁴. Další experimenty, využívající oxidačních činidel pro inaktivaci CD p53 o plné délce (fl p53) a monoklonálních protilátek k blokování specifických epitopů v její CTD, potvrdily klíčovou úlohu CTD pro SCS vazbu. V další studii jsme odhalili rozdílné vlastnosti „latentní“ a „aktivní“ p53 při rozpoznání DNA poškozené cisplatinou⁵. Experimenty využívající delečních mutant p53 naznačily primární úlohu CTD p53 při vazbě na platinovanou DNA. CTD pravděpodobně přispívá též ke schopnosti proteinu p53 rozpoznávat strukturní změny p53CON vyvolané superhelicitou DNA⁶; fl p53 se vázala s výrazně vyšší afinitou na některé p53CON, pokud byly přítomny v scDNA, než na stejné sekvence

přítomné v relaxované DNA, zatímco p53 neobsahující C-terminální DNA vazebné místo tuto schopnost neměla.

Tato práce byla financována granty GAČR 204/02/0734 a AVČR S5004009. Autoři děkují za spolupráci na tomto výzkumu kolegům z BFÚ AVČR (V. Brabec, J. Kašpárková) a z MOÚ (B. Vojtěšek, Š. Pospíšilová).

Literatura

- (1) Appella, E.; Anderson, C. W. Eur J Biochem 2001, 268, 2764-2772.
- (2) Yakovleva, T.; Pramanik, A.; Kawasaki, T.; Tan-No, K.; Gileva, I.; Lindegren, H.; Langel, U.; Ekstrom, T. J.; Rigler, R.; Terenius, L.; Bakalkin, G. J Biol Chem 2001, 276, 15650-15658.
- (3) Janus, F.; Albrechtsen, N.; Dornreiter, I.; Wiesmuller, L.; Grosse, F.; Deppert, W. Cell Mol Life Sci 1999, 55, 12-27.
- (4) Brazdova, M.; Palecek, J.; Cherny, D. I.; Billova, S.; Fojta, M.; Pecinka, P.; Vojtesek, B.; Jovin, T. M.; Palecek, E. Nucleic Acids Res 2002, 30, 4966-4974.
- (5) Fojta, M.; Pivoňková, H.; Brázdová, M.; Kovářová, L.; Paleček, E.; Pospíšilová; Vojtěšek, B.; Kašpárková, J.; Neplechová, K.; Brabec, V. Biochem. Pharm. submitted 2003.
- (6) Paleček, E.; Jagelská, E.; Brázda, V.; Pečinka, P.; Karlovská, L.; Brázdová, M. submitted 2003.

VYUŽITÍ IONTOMĚNIČOVÉ KOLONY K HPLC DETEKCI POLYMORFNÍCH ÚSEKŮ DNA USE OF ION-EXCHANGER COLUMN FOR THE HPLC DETECTION OF POLYMORPHIC SITES OF DNA

¹Y. El Khaled, ¹R. Hladilová, ¹V. Šimek, ²P. Zvolský, ³V. Mikeš, ¹O. Šerý
¹Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37, Brno
²Psychiatrická klinika, 1. LF UK, Ke Karlovu 11, Praha
³Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Metodika HPLC výrazně usnadňuje, urychluje a zlevňuje detekci DNA polymorfizmů ve srovnání s detekcí na agarozových nebo polyakrylamidových gelech, navíc pak umožňuje vyloučení práce s toxickými látkami, které se běžně používají při přípravě elektroforetických gelů - ethidium bromid nebo akrylamid. Další výhodou je automatizace měření a lepší rozlišení především krátkých fragmentů.

Jako nejvhodnější kolona pro HPLC detekci polymorfních úseků DNA je iontoměničová kolona plněná neporézní maticí, na které je kovalentně navázána fáze – diethylaminoethylové zbytky, které matici udělají kladný náboj. K vymytí DNA z kolony se používá gradient chloridu sodného, kdy chloridové ionty postupně vytěsní navázané molekuly DNA.

V naší laboratoři je studován vztah mezi alkoholizmem a polymorfizmy kandidátních genů. COMT (catechol-O-metyltransferáza) je důležitým enzymem v metabolismu dopaminu, který je zkoumán v souvislosti s alkoholizmem. Funkční polymorfizmus enzymu je způsoben záměnou guaninu na 158 pozici za adenin v membránově vázané formě COMT a na pozici

108 v sérové formě COMT, což vede k záměně valinu (V) za methionin (M) v primární struktuře výsledného enzymu. Polymorfismus se vyskytuje ve dvou formách: alela M - enzym má nízkou aktivitu, předpokládá se vztah alely k závislosti na alkoholu, alela V - enzym má vysokou enzymovou aktivitu. U osob s nízkou enzymovou aktivitou dochází k pomalému odbourávání dopaminu, jehož hladina je působením etanolu zvýšená. Předpokládá se proto, že tito lidé mají dispozici ke vzniku alkoholové závislosti spíše než homozygoti VV nebo heterozygoti.

Metodika iontoměničové HPLC (kolona TSK-gel DEAE NPR) byla použita pro detekci polymorfismu Val158Met genu pro COMT. Studovaný soubor zahrnoval 529 osob (251 kontrolních osob a 278 alkoholiků). DNA byla izolována z krve s využitím komerčně dostupného kitu UltraClean BloodSpin Kit (MoBio, USA). Pro genotypizaci byla použita metodika PCR s následnou restrikční analýzou enzymem Hsp92II (Jonsson et al., 1997). DNA produkt restrikčního štěpení byl detekován jednak na agarózovém gelu značeném ethidium bromidem, jednak pomocí metody HPLC. U kontrolních osob byla zjištěna frekvence alely M 0,49, u alkoholiků 0,47. Rozdíl mezi oběma skupinami osob nebyl statisticky významný ($p = 0,25$). V dalších analýzách nebyl objeven statisticky významný rozdíl v alelických a genotypových frekvencích ani po rozdělení souboru osob podle pohlaví.

Z výsledků naší studie vyplývá, že polymorfismus Val158Met genu pro COMT se samostatně nepodílí na dispozicích k závislosti na alkoholu, což ale nevylučuje jeho možnou účast na dispozicích k závislosti na alkoholu společně v kombinaci s dalšími polymorfizmy.

Podporováno grantem IGA MZ ČR č. NF 5991-3, grantem IGA MZ ČR č. NF 6520-5 a grantem FRVŠ č. 790/2002.

ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA ADUKTŮ DNA S KOMPLEXI OXIDU OSMIČELÉHO ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF DNA ADDUCTS WITH COMPLEXES OF OSMIUM TETROXIDE

L.Havran, M. Fojta, S. Billová, R. Kizek, E. Paleček
Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135 Brno

Komplexy oxidu osmičelého s vhodným dusíkatým ligandem jsou používány jako chemické sondy struktury DNA již řadu let. Oxid osmičelý a 2,2' – bipyridin reaguje pouze s jednořetězovou DNA. Je-li jako ligand použit 1,10 – fenantrolin vzniká adukt i s dvouřetězovou DNA. Reakce se přednostně účastní zbytek thyminu, podstatně méně zbytek cytosinu. Purinové baze jsou prakticky nereaktivní. Pro studium těchto aduktů lze použít různé elektrochemické metody, neboť oxid osmičelý a jeho komplexy jsou elektroaktivní jak na rtuťových tak i uhlíkových elektrodách [1-3].

Na rtuťových elektrodách lze pomocí řady elektrochemických metod získat dva typy signálů studovaných aduktů, faradaycké (oxidačně-redukční) v důsledku postupné redukce (oxidace) atomu osmia v molekule aduktu a katalytické, kdy v důsledku přítomnosti zredukovaného aduktu na povrchu rtuťové elektrody dochází ke katalytickému vylučování vodíku ze základního elektrolytu. Katalytický signál může být za vhodných experimentálních podmínek použit pro velmi citlivé stanovení jednořetězové DNA [4].

Podobně jako na rtuťových lze na uhlíkových elektrodách získat řadu faradayckých signálů postupné redukce (oxidace) atomu osmia. Uhlíkové elektrody jsou vhodné pro analýzu

modifikační směsi, neboť lze nezreagovaný komplex OsO_4 – ligand selektivně odstranit z povrchu pracovní elektrody extrakcí nepolárním rozpouštědlem [5,6]. Pro analýzu reakčních směsí jsou zvláště vhodné elektrody z pyrolytického grafitu [6].

Výše popsaných vlastností aduktů DNA s komplexi OsO_4 a dusíkatého ligandu bylo úspěšně použito při konstrukci elektrochemických senzorů hybridizace DNA. [6,7]

Práce vznikla za podpory grantu 204/00/D49 GAČR

1. E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, and M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8:497 (1981).
2. E. Lukasová, F. Jelen, and E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 1:53 (1982).
3. E. Palecek and M. A. Hung, *Anal. Biochem.* 132:236 (1983).
4. R. Kizek, L. Havran, M. Fojta and E. Palecek, *Bioelectrochemistry* 55, 1-2, 119 (2002)
5. M. Fojta, L. Havran, R. Kizek and S. Billova, *Talanta* 56, No.5, 867(2002)
6. M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, *Electroanal.* 2002, in press
7. E. Palecek, R. Kizek, L. Havran, S. Billova, M. Fojta, *Anal Chim Acta* 469: (1) 73 (2002)

KVANTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ SPEKTROFOTOMETRIE,
ELEKTROFORÉZY A ELEKTROCHEMIE
QUANTIFICATION OF PROTEINS BY MEANS OF SPECTROPHOTOMETRY,
ELECTROPHORESIS AND ELECTROCHEMISTRY

René Kizek¹, Jan Vacek¹, Marie Brázdová¹, Libuše Trnková²

¹*Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno*

²*Katedra teoretické a fyzikální chemie, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno*

Po rozluštění sekvence lidského genomu se dostává do popředí zájmů vědců studium proteinů, tzv. proteomika. Hlavními sledovanými ukazateli v proteomice je vztah struktury koncentrace a funkce zkoumaného proteinu. Pro kvantitativní stanovení proteinů existuje řada metod, při jejichž výběru se řídíme těmito hlavními kritérii: (a) množstvím proteinu dostupného pro analýzu, (b) koncentrací proteinu ve vzorku, (c) specifícností analýzy a (d) snadností a spolehlivostí dané metody. Některé běžně používané a snadno realizovatelné metody vyžadují jednoduchou instrumentaci a přitom jsou vysoce citlivé. Mezi takové metody patří detekce proteinu na polyakrylamidových gelech, vhodná zvláště pro purifikované proteiny. Pro stanovení proteinů v roztoku jsou vhodné i spektrofotometrické metody založené na absorpci záření v UV a UV-Vis oblasti. Jednou z alternativních metod splňující jednoduchou instrumentaci a relativně vysokou citlivost je elektrochemie, jako např. diferenční pulzní voltametrie – DPV a chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza – CPSA.

Modelovými proteiny pro porovnání spektrofotometrických, elektroforetických a elektrochemických měření byly hovězí albumin (bovine serum albumin - BSA, M_r 67 kDa) a nádorový tumorový supresorový protein p53 (M_r 43 kDa). Spektrální měření byla uskutečněna na spektrofotometru Hewlett Packard, polyakrylamidová gelová elektroforéza na elektroforetickém zařízení Biorad a elektrochemická měření na analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, The Netherlands) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Zurich, Switzerland). Zatímco pro stanovení koncentrace obou proteinů při 276 nm bylo využita absorpce

tryptofanu, pro spektrální analýzu kolorimetricky při 595 nm bylo využito Bradfordova barvení. V případě elektroforézy byl gel barven stříbrem nebo Coomassie Brilliant Blue. Elektrochemicky byly koncentrace stanoveny metodami DPV a CPSA.

Z porovnání výsledků získaných výše uvedenými metodami vyplývá, že spektrofotometrie umožňuje stanovit koncentrace proteinů v jednotkách mikrogramů/mL a elektroforéza v jednotkách nanogramů/mL. I když je kvantifikace proteinů pomocí elektrochemie srovnatelná s těmito dvěma detekčními limity, DPV a CPSA ve spojení s adsorptivním strippingem umožňují stanovení proteinů ve velmi malých objemech zkoumaného roztoku (jednotky μL).

Literatura

Laemmli, U.K. Nature, 227, 1970, 680-5

Bradford, M.M.. Anal. Biochem. 72, 1976, 248-54

Eckerskorn, C., Jungblut, P., Mewes, W., Klose, J., Lottspeich, F. Electrophoresis 9, 1988, 830-8

Tomschik, M., Havran, L., Fojta, M., Paleček, E.: Electroanalysis 8, 1996, 7

Brázdová M., Kizek R., Havran L., Paleček E.: Bioelectrochemistry, 55, 2002, 115-118

Trnková L., Kizek R., Vacek J.: Bioelectrochemistry, 56, 2002, 57-61

Kizek R., Trnková L. Paleček E. Anal. Chem. 73, 2001, 4801-4807

Práce byla finančně podporována granty 203/02/0422 GA ČR, A 1163201 GA AV ČR a FRVŠ 1203/2003.

ASOCIAČNÍ STUDIE VZTAHU POLYMORFIZMU GENU PRO CCR5 KE VNÍMÁNÍ AKUTNÍ BOLESTI THE ASSOCIATION STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CCR5 GENE POLYMORPHISM AND ACUTE PAIN FEELING

¹R. Štaif, ¹O. Šerý, ¹R. Hladilová, ¹Y. El Khaled, ¹V. Šimek, ²O. Hrazdilová, ²P. Ševčík
¹Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Katedra srovnávací fyziologie živočichů
a obecné zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37, Brno
²ARK, FN u sv. Anny, Pekařská 53, 656 91 Brno

Bolest je nepříjemný senzorický a emoční zážitek spojený se skutečným nebo potencionálním poškozením tkání. Na rozdílném vnímání bolesti se podílí nejen emocionální, kulturní a sociální faktory, ale i genetické faktory.

Mezi DNA polymorfizmy, které by mohly souviset s vnímáním akutní bolesti lze zařadit polymorfismus delta 32 genu pro CCR5 receptor. Receptor CCR5 patří mezi receptory pro chemotaktické cytokiny (chemokiny), které jsou zkoumány zejména v souvislosti s rezistencí vůči infekci HIV. Chemokiny rozdělujeme podle struktury na CC- a CXC- chemokiny, podobně rozdělujeme i jejich receptory na CC- a CXC-. CCR5 receptor patří mezi chemokinové receptory CC- a jeho přirozenými agonisty jsou beta-chemokiny MIP-1 alfa, MIP-1 beta a RANTES. Chemokiny, které aktivují všechny z dosud poznáných chemokinových receptorů zvyšují Ca^{2+} koncentraci a vyvolávají podobnou odezvu na nociceptory jako bradykinin, ATP a kapsicin, podle některých výzkumů též stimulují uvolňování substance P.

Delta 32 polymorfismus genu pro CCR5 je deleční polymorfismus, který způsobuje zkrácení sekvence DNA i výsledného proteinu, který je nefunkční – nedostane se na povrch buňky. Do asociační studie bylo zařazeno 100 pacientů po plánované tonzilektomii. Hodnocena byla intenzita a tolerance pooperační bolesti. Intenzita pooperační bolesti byla hodnocena pomocí Husskinsonovy stomilimetrové vizuální analogové škály VAS. Intenzita bolesti byla poprvé monitorována po extubaci pacienta, dále každou hodinu v průběhu prvních osmi hodin po operaci.

Vzorek krve byl nejprve zamražen na minus 20 stupňů Celsia a v termoboxu dopraven do laboratoře. Z krve byla vyizolována DNA izolačním kitem UltraClean Blood Spin Kit (MoBio, USA). Vyizolovaná DNA posloužila jako templát pro řetězovou polymerázovou reakci (PCR). Výsledné produkty byly zviditelněny na 2 % agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. Gel byl vyfotografován a z fotografie získaná data byla zaznamenána a využita pro statistické zpracování.

Tento projekt byl podporován grantem IGA MZ ČR č. NM 7146-3/2002 a grantem FRVŠ č. 783/2002.

THE FIRST IDENTIFICATION OF SUDAN I [1-PHENYLAZO-2-HYDROXYNAPHTHALENE] AS A POTENTIAL CARCINOGEN FOR HUMAN

Václav Martínek¹, Helena Rýdlová¹, Petr Hodek¹, Eva Frei² and Marie Stiborová¹

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, The Czech Republic*

²*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Reserach Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany*

1-Phenylazo-2-hydroxynaphthol (Sudan I, C.I. Solvent Yellow 14) is a liver and urinary bladder carcinogen in mammals [1]. We compared the ability of hepatic microsomal samples from different species including human to metabolize Sudan I. Comparison between experimental animals and human cytochromes P450 (CYP) is essential for the extrapolation of animal carcinogenicity data to assess human health risk. Human microsomes generated the pattern of Sudan I metabolites reproducing that formed by hepatic microsomes of rats. Using hepatic microsomes of rats pre-treated with specific CYP inducers, microsomes from Baculovirus transfected insect cells expressing recombinant human CYP enzymes, purified CYP enzymes, and selective CYP inhibitors, we found that rat CYP1A1 and recombinant human CYP1A1 are the most efficient enzymes metabolizing Sudan I. Microsomes from livers (the target of Sudan I carcinogenicity) of different human donors were utilized to estimate whether authentic human CYPs oxidize Sudan I. Using western blot analysis and N-terminal sequencing, we were able to detect and quantify CYP1A1 in human hepatic microsomes. The sequence of nine amino acids of the protein band cross-reacting with anti-rat CYP1A1 in human microsomes, LFPISMSAT, matched the sequence of human CYP1A1 perfectly (residues 2 – 10). CYP1A1 expression levels varied significantly among the different human microsomes (0.04 - 2.4 pmol/mg protein), and constituted less than 0.6% of the total hepatic CYP complement. All human hepatic microsomal samples oxidized Sudan I to C-hydroxymetabolites. Moreover, using the nuclease P1-enhanced version of the ³²P-post-labeling assay, we found that human microsomes were competent in activating Sudan I to form adducts with DNA. The role of specific CYP enzymes in the human hepatic microsomal

metabolism was investigated by correlating the CYP-catalytic activities (or CYP contents) in each microsomal sample with the levels of individual metabolites and/or Sudan I-DNA adducts formed by the same microsomes and by examining the effects of agents that can inhibit specific CYP in Sudan I metabolism. Based on these studies, we attribute most of Sudan I metabolism in human microsomes to CYP1A1 and CYP3A4. These results, the first report on the metabolism of Sudan I by human CYP enzymes, strongly suggest a carcinogenic potency of this rodent carcinogen for humans.

References

- [1] Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M: Chem. Res. Toxicol. 8, 489-498 (1995).

Supported by Grant Agency of Charles University (204/2001/B CH PrF, Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

TRANSCRIPTOME OF *TREPONEMA PALLIDUM*: GENE EXPRESSION PROFILING OF TREPONEMES GROWN IN RABBITS *TREPONEMA PALLIDUM* IZOLOVANÁ Z INFIKOVANÝCH KRÁLÍKŮ: STUDIUM ÚROVNĚ GENOVÉ EXPRESE UŽITÍM DNA ČIPŮ

David Šmajš¹, Petra Matějková¹, Steven J. Norris² a George M. Weinstock³

¹*Biologický ústav LF MU v Brně, Joštova 10, Brno 662 43, Česká republika*

²*Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas – Houston Medical School, 6431 Fannin Street, Houston TX 77030, USA*

³*Human Genome Sequencing Centre, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Alkek NI519, Houston, TX 77030, USA*

DNA microarray chips containing all 1039 annotated ORFs of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols) were printed on glass slides. For 1034 ORFs (out of 1039), signals higher than threshold (average of negative control spots + 3 SDs) were detected for both labeled RNA and DNA. Total RNA isolated from treponemes grown in rabbit testes was labeled and standardized to the labeled treponemal chromosomal DNA. Genes were sorted according to the relative transcription level and the operon structure of *T. pallidum* genome was proposed. The most intensively transcribed genes were found to correlate with most prominent spots identified on 2D SDS PAGE gels indicating that the transcription rate approximately corresponds to the level of protein synthesis. Gene expression of 84 genes was independently measured using real-time PCR approach and the results were compared to the data obtained by DNA microarray technique. In addition, expression levels of treponemal genes were measured using large insert library of *T. pallidum* DNA in *E. coli*. Significant gene expression differences were found and the average level of gene expression in *E. coli* computed for 10-gene windows appears to correlate inversely to the number of individual gene copies in the library. These data indicate that the level of gene expression in the host organism is one of the major factors contributing to efficiency of DNA cloning.

MECHANISM OF DNA ADDUCT FORMATION BY ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE ACTIVATED BY CYTOCHROMES P450 *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Marie Stiborová¹, Lucie Bořek-Dohalská¹ and Eva Frei² ¹*Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2*

²*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg*

Ellipticine is a plant alkaloid exhibiting potent antineoplastic and anti-HIV activities. This agent and some its derivatives are used in the therapy of breast cancer and have multiple cellular targets. Among these, the inhibition of topoisomerase II after intercalation into DNA, was hitherto considered the most important property for its cytotoxicity. It is evident that these mechanisms of ellipticine action are not limited to cancer cells and may not explain sufficiently the specific antitumor activity of the compound. No discrimination between healthy tissues and tumor cells in ellipticine uptake is to be expected, because ellipticine is highly hydrophobic and enter cell membranes by diffusion. Recently, we found that ellipticine also forms covalent DNA adducts and that the formation of the major adduct is dependent on the activation of ellipticine by cytochrome P450 (CYP) [1, 2]. The most potent activating human enzyme is CYP3A4, followed by CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 [1]. These adducts were also detected in DNA of V79 cells exposed to ellipticine. The most efficient activator in these cells was CYP3A4, followed by CYP1A2 and CYP1A1 [2].

Two ellipticine-DNA adducts were also found in DNA of several organs of rats exposed to ellipticine. The formation of the major ellipticine-DNA adduct was highly correlated with levels of CYP3A and CYP1A expression in rat organs. This indicates that these cytochromes P450 participate in ellipticine activation also *in vivo*. Cross referencing of ellipticine-DNA adducts formed *in vivo*, or in DNA of V79 cells with those formed in DNA with ellipticine *in vitro* by ion-exchange chromatography and reversed-phase HPLC demonstrated the identity of these adducts.

In order to elucidate the mechanisms of ellipticine-DNA adduct formation, we focused on identification of the target deoxynucleotides in DNA for ellipticine binding and on the cytochrome P450-mediated metabolism of this drug. We identified deoxyguanosine as the target for cytochrome P450-mediated ellipticine binding to DNA using polydeoxyribonucleotides and deoxyguanosine 3'-monophosphate. Five metabolites containing an oxygen atom in their molecules (M1-M5) are generated by CYPs; two of them were identified to be 9-hydroxy- and 7-hydroxyellipticines. One ellipticine metabolites (M3), formed predominantly by CYP3A4, is responsible for the formation of the major ellipticine-deoxyguanosine adduct in DNA. The second adduct is generated by M5 metabolite or is formed also independently of enzymatic activation.

Activation of ellipticine to a DNA binding species by CYPs is an interesting finding in view of the compound's activity against breast cancer. These tumors express CYP3A4, CYP1B1 and CYP1A1, which we showed to effectively activate ellipticine. The cytochrome P450-dependent DNA adduct formation we describe is a novel mechanism for the ellipticine action and might, in part, explain its tumor specificity.

References.

- 1) Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1675 (2001).
- 2) Frei E., Bieler C.A., Arlt V., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.*, 64, 289 (2002).

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

THE EVALUATION OF 2-NITROANISOLE AND 2-ANISIDINE CARCINOGENICITY FOR HUMAN

Markéta Mikšánová¹, Helena Rýdlová¹, Eva Frei² and Marie Stiborová¹

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, The Czech Republic*

²*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany*

2-Nitroanisole and 2-anisidine are important industrial chemicals posing a high risk to human population. Both chemicals are strong carcinogens for rats and mice. An industrial accident of the Hoechst company in Germany caused a large-scale leakage of this compound in 1993 and subsequent regional contamination. The mechanism of carcinogenicity of both chemicals, unknown until recent time, was resolved in our laboratory.

We show by the ³²P-postlabeling technique for the first time that both chemicals are genotoxic carcinogens, forming covalent adducts in DNA of target tissues (urinary bladder, and in a lesser extent, kidney, spleen and liver) in rats [1]. 2-Nitroanisole is activated by cytosolic reductases, mainly xanthine oxidase, to species binding to DNA. Oxidation of this carcinogen by cytochromes P450 (CYP2B and 2E1) leads to its detoxication. Besides CYPs, 2-anisidine is also activated by peroxidases. *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine is a proximate carcinogen produced by reduction of 2-nitroanisole and oxidation of 2-anisidine. The nitrenium (or carbenium) ion is the reactive species generating covalent adducts with deoxyguanosine in DNA *in vitro* and *in vivo*.

In order to determine the human enzymes responsible for metabolism of both carcinogens, human microsomal and cytosolic fractions were utilized in the study. The role of specific cytosolic reductases in the activation of 2-nitroanisole by human enzymes was investigated by correlating the DT-diaphorase- and xanthine oxidase-catalytic activities in each cytosolic sample with the levels of *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine metabolite formed by the same cytosols and by examining the effects of agents that can inhibit these specific reductases. Based on these studies, we attribute most of 2-nitroanisole activation in human to xanthine oxidase. Furthermore, correlation of CYP-catalytic activities (or CYP contents) in each microsomal sample with the levels of individual 2-nitroanisole detoxication metabolites formed by the same microsomes indicate that CYP2E1 is the major enzyme responsible for detoxication of 2-nitroanisole in human. In similar experiments we study which of human cytochromes P450 are responsible for 2-anisidine oxidation to proximate carcinogenic *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine metabolite generating reactive species binding to DNA.

These results, the first report on the metabolism of 2-nitroanisole and 2-anisidine by human enzymes, strongly suggest a carcinogenic potency of these rodent carcinogen for humans.

References

- [1] Stiborová M., Mikšánová M., Rýdlová H., Schmeiser, H.H., Frei E. (2002) Chem. Listy 96, 946.

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/03/0283) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

ANALÝZA PROTEOMU A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Zbyněk Zdráhal^{1,2}, Břetislav Brzobohatý¹

¹ *Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, ² Laboratoř hmotnostní spektrometrie biomolekul, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno*

Pokroky v technikách používaných pro analýzu sekvence DNA vedly k exponenciálnímu nárůstu vyřešených sekvencí genomů řady organismů. Ke konci roku 2002 bylo zveřejněno 116 kompletních sekvencí genomů včetně genomu člověka a na dalších 586 projektech se pracuje (1).

Přestože znalost genomu je základním kamenem k porozumění molekulárních změn uvnitř buňky, přesné pochopení buněčných procesů je možné pouze při znalosti proteomu. Možnost identifikace proteinů, sledování jejich post-translačních modifikací a poměrných změn v jejich expresi za daných podmínek umožňuje určení jejich funkce při jednotlivých buněčných procesech a jejich vzájemného propojení.

Hmotnostní spektrometrie se stala díky své citlivosti a relativní rychlosti stanovení typickým nástrojem identifikace proteinů resp. jejich primární struktury (2). Pro analýzu proteinů jsou používány převážně dva typy hmotnostních spektrometrů. Prvním typem jsou spektrometry s průletovým hmotnostním analyzátozem a laserovou ionizací za podpory matrice (MALDI-TOF MS), zpravidla v kombinaci se separací proteinů pomocí 2-D gelové elektroforézy. Druhým typem jsou spektrometry s iontovou pastí a ionizací elektrosprejem (ESI- IT MS). Ionizace elektrosprejem umožňuje online spojení s takovými separačními technikami jako je kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. Vlastní identifikace proteinů probíhá po předchozí specifické proteolýze, buď stanovením hmotnosti vzniklých peptidů (MS) a srovnáním s proteinovými databázemi nebo fragmentací jednotlivých peptidů (MS/MS techniky).

V roce 2000 vznikla díky dotaci MŠMT a vzájemné spolupráci PŘF a LF Masarykovy univerzity nová laboratoř, která je vybavena oběma výše uvedenými typy hmotnostních spektrometrů (3) a takto umožňuje přístup k analýze proteinů akademickým pracovištím a přispívá ke zkvalitnění výuky biologických a chemických oborů.

Literatura:

- (1) <http://www.ebi.ac.uk/research/CGG/projects/index.html>
- (2) Proteome Research: Mass Spectrometry; P. James (Ed.), Springer, Berlin, 2001
- (3) <http://www.sci.muni.cz/proteom>

Laboratoř hmotnostní spektrometrie biomolekul byla podporována projekty MSM 143100008 a 143100005.

Prostředky na další dovybavení byly získány z grantu FRVŠ 796/2003.

Sekce mladých - anglické přednášky

HIGHLY SENSITIVE IMMUNOSENSORS FOR DETERMINATION OF ATRAZINE BASED ON THE PIEZOELECTRIC AND SURFACE PLASMON RESONANCE TRANSDUCERS

Jan Příbyl^{1,2}, Petr Skládal², Jan Haláček^{1,2}, Maria Hepel¹, Jakub Dostálek³, Jiří Homola³

¹ *Department of Chemistry, State University of New York at Potsdam, Potsdam, NY 13676, USA*

² *Department of Biochemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, CZ 611 37 Brno, Czech Republic*

³ *Institute of Radio Engineering and Electronics, Czech Academy of Sciences, Chaberská 57, CZ 182 51 Praha 8, Czech Republic*

The improved piezoelectric and surface plasmon resonance immunosensors for the determination of the herbicide atrazine were developed. The piezoelectric quartz crystals (smooth and rough surfaces) were used together with the highly sensitive nanobalance system from ELCHEMA. All measurements were performed in a flow-through arrangement.

Initially, the competitive assay procedure employed the monoclonal anti atrazine antibody D6F3. A mixture of antibody with either standard or sample was pre-incubated for 15 min and then injected to the flow cell with atrazine-modified crystals. The developed immunosensor allowed measuring of atrazine concentrations as low as 0.01 µg/l, the upper limit of detection was 1 mg/l.

The direct piezoelectric immunosensor for atrazine employed the antibody D6F3 covalently immobilized to the sensing surface; an oriented immobilization through Protein A was realized and the sensing surface was stabilized by crosslinking with dimethylpimelimidate. This immunosensor allowed detection of atrazine in samples directly without any labels in concentration range from 1 to 20 µg/l.

Atomic force microscopy (AFM) was used to study of biorecognition layers formed on the mica / gold substrate. AFM images (500 x 500 nm area and 10 nm high resolution) were scanned during the step-by-step deposition of individual sensing layers on the gold surface. In this way, the construction of the biosensing interface was verified.

Alternatively highly sensitive surface plasmon resonance (SPR) transducer was used for construction of both direct and competitive immunosensors for atrazine. All experiments were performed in the flow-trough mode. For the direct measurement anti atrazine antibody D6F3 was immobilized in an oriented way on the gold chip surface. This immunosensor was able to detect atrazine in the concentration range from 1 ng/l to 100 µg/l. However, the dependence of response on atrazine concentration was nonlinear, probably due to the different surface immunocomplex conformations at various atrazine concentrations.

For competitive assay procedures the BSA-atrazine conjugate immobilized via cystamine and glutaraldehyde was chosen as a sensitive biolayer. Competitive measurements were performed with either D6F3 or E6B4 anti atrazine monoclonal antibodies at concentration 40 µg/ml. Limit of detection for atrazine obtained during initial experiments was 10 ng/l.

Both piezoelectric and SPR-based immunosensors appeared to be suitable for rapid, sensitive and cost-effective assay of atrazine.

THE CKII RECEIVER DOMAIN: ATTEMPTS AT BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION
PŘÍJÍMAČOVÁ DOMÉNA HISTIDIN KINÁZY CKII: POKUS O BIOCHEMICKOU
CHARAKTERIZACI

Petra Borkovcová¹, Zbyněk Zdráhal², Hana Konečná³ and Břetislav Brzobohatý⁴
*Laboratory of Functional Genomics and Proteomics^{2,3,4}, Faculty of Science, Masaryk
University, Kotlářská 2, CZ-611 37 Brno, Czech Republic*
*Laboratory of Mass Spectroscopy of Biomolecules², Faculty of Science, Masaryk University,
Kotlářská 2, CZ-611 37 Brno, Czech Republic.*
Institute of Biophysics AS ČR, Královopolská 135, CZ 612 65 Brno, Czech Republic^{1,4}.

Protein phosphorylation is a widely occurring mechanism for regulating biological processes, including intracellular signal transduction. In eukaryotes, protein phosphorylation cascades involving a number of protein tyrosine- and/or serine/threonine-kinases have been well studied. However, histidine kinases from bacteria, yeasts and higher plant signaling cascades have not been investigated as rigorously.

CKII, a putative cytokinin receptor from *A. thaliana*, belongs to a family of a sensor hybrid histidine kinases. It consists of three domains: an extracellular domain perceives a signal (the hormone) which is the trigger for autophosphorylation of a conserved histidine in the cytoplasmic kinase domain. The phosphoryl group is then transferred to an aspartate in the cytoplasmic receiver domain. A subsequent cascade of transfers of the phosphoryl group culminates in activation of the response regulator(s) that regulate gene expression.

We produced the CKII receiver domain as a recombinant derivative with a double His-tag in *E. coli*. The fusion protein was purified to a purity of greater than 95% by metal chelate affinity chromatography. Here we report results of investigation of structure (size and oligomerisation) using Blue-native PAGE and gel-filtration chromatography. Attempts at identifying, using MALDI-TOF, the phosphorylation competence of the aspartate which is expected to be the phosphorylation target will be discussed.

This work was carried out with aid from the grants LN00A081 a MSM143100008, from the Ministry of Education, Czech Republic.

ANALÝZA PROTEOMU BAKTERIE *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*
ANALYSIS OF PROTEOME OF BACTERIUM *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*

Pavel Bouchal¹, Petra Přecechtělová¹, Zbyněk Zdráhal² a Igor Kučera¹
¹ *Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Kotlářská 2,
611 37 Brno*
² *Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř funkční genomiky a
proteomiky, Kotlářská 2, 611 37 Brno*

Gramnegativní bakterie *Paracoccus denitrificans* se vyznačuje značnou adaptovatelností na růstové podmínky: je schopna existence za podmínek aerobních či anaerobních, přičemž jako terminální akceptory může sloužit mnoho substrátů: kromě kyslíku také NO₃⁻, NO₂⁻ či plynný N₂O. Změna v expresi proteinů při přechodu z aerobních podmínek na anaerobní zřejmě souvisí s regulačními proteiny citlivými k azidu. Pro sledování všech těchto změn expresního profilu se jeví jako velice perspektivní soubor proteomických metod.

Pro komplexní analýzu proteinového složení *P. denitrificans* byla nově zavedena metodika vysokorozlišovací dvourozměrné elektroforézy (2-DE) s imobilizovanými pH gradienty v prvním rozměru, a to jak v analytickém, tak i mikropreparativním uspořádání.

Pro analýzu celobuněčného proteomu jsme vyvinuli postup přípravy vzorků a optimalizovali protokol pro jejich analýzu dvourozměrnou elektroforézou. Tento protokol může být použit např. pro srovnání změn expresního profilu vyvolaných různými terminálními akceptory.

Pro metodicky velmi komplikovanou 2-DE analýzu membránových proteinů, které jsou však často funkčně důležitější, jsme srovnávali různé solubilizační postupy, přičemž byly využity v současné době nejúčinnější typy zwitteriontových detergentů. Kromě nejvhodnějšího složení vzorkového pufru zahrnuje optimalizovaný protokol také speciální pufový systém pro SDS-PAGE. 2-DE gely získané tímto postupem byly dále srovnány s gely získanými z téhož vzorku pomocí dříve používané varianty 2-DE s nosnými amfolity.

Vypracovaným protokolem jsme sledovali vliv anaerobiosy na změny proteinového složení membrány bakterie *P. denitrificans*, přičemž některé z význačných proteinů na proteinové mapě již byly analyzovány MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií a úspěšně identifikovány.

Práce byla podpořena granty Fondu rozvoje vysokých škol č. 569/2001, 740/2002 a Grantové agentury České Republiky č. 203/01/1589.

EXPRESÉ GENU OTEVŘENÉHO ČTECÍHO RÁMCE 7 KÓDUJÍCÍ
NUKLEOKAPSIDOVÝ PROTEIN N VIRU REPRODUKČNÍHO A RESPIRAČNÍHO
SYNDROMU PRASAT PROSTŘEDNICTVÍM BAKULOVIROVÉHO VEKTORU V
HMYZÍCH BUŇKÁCH

EXPRESSION OF OPEN READING FRAME 7 GENE ENCODING THE
NUCLEOCAPSID PROTEIN N OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY
SYNDROME VIRUS BY MEANS OF A BACULOVIRUS VECTOR IN INSECT CELLS

E. Kosinová, I. Pšikal, R. Tesařík, L. Rodák

*Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 32, Brno, Czech Republic, e-mail:
kosinova@vri.cz*

Baculoviruses are used as expression vectors for highly effective obtaining of heterologous proteins. For this purpose, the AcMNPV virus (*Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*) propagated in cultures of insect cells (Sf-9), derived particularly from larvae of *Spodoptera frugiperda* (*Noctuidae*, *Lepidoptera*), is used.

The transfer factor in the Bac-N-Blue system (Invitrogene) is an *E. coli* plasmid that contains gene for polyhedrin under the control of the strong promoter *plh*, DNA sequences for completion of homologous segments of the 5' end of bacterial *LacZ* gene, ORF1629 gene necessary for baculovirus replication, polylinker for insertion of heterologous DNA, and signals for termination of transcription and for polyadenylation. Thus, along with the required insert, gene for the production of β -galactosidase, which is necessary for resumption of the replication potential of recombinant baculovirus, that was used in its linearised form for transfection, is introduced into the recombinant baculovirus by homologous recombination. The selection of recombinant baculoviruses (occ⁻) is enabled by completion of *LacZ* gene. Plaques produced by this phenotype stain blue in the presence of a chromogen.

Recombinant baculovirus expressing complete ORF7 gene of the European serotype of PRRS virus (V-516) was constructed in an eukaryotic system of recombinant protein expression. The recombinant baculovirus encoded 128 amino acids (aa) of the structural nucleocapsid

protein N. D-1/5/20 baculovirus clone, purified by selection of blue plaques, reached the titre $2,2 \times 10^8$ PFU . ml⁻¹ in its 6th passage. The production and identity of the ~15 kD recombinant protein N (rN) was tested by SDS-PAGE under reducing conditions and by immunoblotting with a PRRS-positive polyclonal porcine blood serum and the monoclonal antibody WB4 obtained from the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK. The concentrations of the rN protein ranged from 80 to 250 µg/ml.

The recombinant antigen (rN) of PRRS virus was used at 2 µg/ml for the development of set for indirect ELISA (PRRS IgG rELISA) for the demonstration of antibodies to PRRS virus in porcine blood sera. Diagnostic parameters of the set were tested by simultaneous examination of 154 porcine blood sera with the diagnostic set IDEXX HerdCheck ® ELISA. The results indicated a higher specificity (95%) of the set PRRS IgG rELISA for the demonstration of antibodies to the European serotype of PRRS virus in that 25 of the tested 154 sera were positive by PRRS IgG rELISA and negative by IDEXX ELISA PRRSV. The sensitivity of PRRS IgG rELISA reached 93%.

Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency (Project No. MO3-99-01) of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

INDUCTION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* IN NEWBORN KIDS STIMULATED BY SUBCUTANEOUS OR INTRANASAL ADMINISTRATION OF LIPOSOMAL MURAMYL DIPEPTIDE DERIVATIVE

Andre Kašná¹, Jaroslav Turánek¹, Břetislav Koudela², Miroslav Ledvina³

¹ Veterinary Research Institute, 621 32 Brno, Hudcova 70, Czech Republic

² Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic

³ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, Czech Republic

e-mail: turanek@vri.cz

Effects of the liposome-encapsulated lipophilic immunomodulator β-D-GlcNstearoyl-(1-4)-norMurNAc-L-Abu-D-isoGln (DDDS_t) on resistance to *Cryptosporidium parvum* infection was investigated in 6-day-old kids. The liposomal preparation was administered subcutaneously or intranasally twice at doses of 100 µg, 200 µg, or 1000 µg per kid before infection. The treatment schemes were i) 72 and 24 hours before infection, ii) 24 hours before and 24 hours after infection (oral inoculation with 1×10^7 oocysts of *C. parvum* in 5 ml PBS). One half of kids in each experimental group were killed at post-infection day 5 and the remaining kids at post-infection day 10. It was shown that i.n. administration of DDS_t at the cumulative dose of 2000 µg per kid days 3 and 1 before infection led to increased clearance of coccidian parasites from various parts of the intestine. On the basis of histological examination the distribution of oocysts in the intestine and the severity of the infection were classified the 5 day with strong reduction of infection in comparison to control group. Histological examination at post-treatment day 5 demonstrated substantial reduction of infection rate when compared with controls. No cryptosporidia were found on the mucosal surface of the treated kids at day 10, while the intestines of the control kids were still infected. Only residual infection was found at day 10 after s.c administration of liposomal DDS_t (cumulative dose 2000 µg per kid). All doses and routes of administration were very effective with respect to suppression of infection especially at its peak at day 5. The in vivo immunomodulation probably resulted in the activation of intraepithelial lymphocytes which

are responsible for resolution of the intestinal infection. The mechanism(s) of stimulation of intestinal lymphocytes after s.c. or i.n. administration is unknown, but signaling via the neuro-immune network seems to be the proper way for future research.

Acknowledgement

This work was supported by grant no. MZE-M03-99-01 of Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

ZMĚNY PLAZMATICKÝCH HLADIN OREXINU A BĚHEM REDUKCE TĚLESNĚHMOTNOSTI U OBÉZNÍCH DĚTÍ A ADOLESCENTŮ CHANGES OF OREXIN A-PLASMA LEVELS DURING WEIGHT-REDUCTION THERAPY IN OBESE CHILDREN AND ADOLESCENTS

Bronský, J.¹, Pechová, M.¹, Nedvídková, J.², Tůmová, M.³, Průša, R.¹

¹ Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol,

V Úvalu 84, 150 06, Praha 5 - Motol

² Endokrinologický ústav, Praha

³ Katedra antropologie, Univerzita Karlova, Fakulta přírodních věd, Praha

Orexin A je hypothalamický neuropeptid (33 aminokyselin) ovlivňující příjem a trávení potravy. Byl objeven v roce 1998 spolu s orexinem B (28 aminokyselin), se kterým má společný prekurzor – preproorexin. Buňky produkující orexin A jsou glukosenzitivní a mají na svém povrchu receptory pro leptin. Intracerebroventrikulární aplikace orexinu A působí zvýšení příjmu potravy, motility a sekrece trávicího traktu. Krátkodobá restrikce příjmu potravy způsobí zvýšení koncentrace preproorexinové mRNA v laterálním hypothalamu. U obézních pacientů jsou sniženy plazmatické hladiny orexinu A.

Zjišťovali jsme plazmatické hladiny orexinu A u 24 obézních pacientů (18 dívek a 6 chlapců; průměrný věk 13,8 a 15,9 roků) na začátku a po ukončení 5 týdenní lázeňské redukční léčby obezity. K měření jsme použili RIA kit s extrakcí pro lidský Orexin A (*Phoenix Pharmaceuticals*). Dále jsme u pacientů stanovovali sérové hladiny leptinu, IGF1, IGFBP-3 a celkového cholesterolu. U všech pacientů bylo stanoveno množství tělesného tuku Matiegkovou metodou na základě kaliperování.

Průměrné plazmatické hladiny orexinu A u obézních dívek před redukční terapií byly v rozmezí $15,31 \pm 1,62$ pg/ml (mean \pm SEM) a po ukončení terapie $21,44 \pm 2,747$ pg/ml a u chlapců $8,01 \pm 1,62$ pg/ml a $14,48 \pm 2,335$ pg/ml. Plazmatické hladiny orexinu A byly signifikantně vyšší jak u dívek ($p = 0,0349$) tak u chlapců ($p = 0,0419$) po redukci tělesné hmotnosti. Při hodnocení bez ohledu na pohlaví byla signifikance ještě vyšší ($p = 0,0063$). V obou skupinách jsme našli negativní korelaci mezi hladinami orexinu A a množstvím tělesného tuku.

Během snížení množství tělesného tuku se zvyšují plazmatické hladiny orexinu A a snižují hladiny leptinu. Tento fakt podporuje hypotézu, podle níž je hypothalamická produkce orexinu A ovlivněna negativní zpětnou vazbou z tukové tkáně prostřednictvím leptinových receptorů. Systém orexinu A a jeho receptorů se může stát předmětem zájmu při vývoji nových léků ovlivňujících nutriční stav organismu.

Projekt byl podpořen grantem IGA MZ NB 6597-3 a Institutem DANONE.

STRUKTURA POHLAVNÍCH CHROMOZÓMŮ KNOTOVKY BÍLÉ THE STRUCTURE OF *SILENE LATIFOLIA* SEX CHROMOSOMES

Roman Hobza, Jiří Široký, Martina Lengerová, Boris Vyskot
Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Sex determination in dioecious plants can correlate with evolution of heteromorphic sex chromosomes as in animals. The sex determining gene complexes often accumulate on the sex chromosomes. Plants possessing sex chromosomes are an ideal model for evolutionary biology because they represent various stages of the X and Y chromosome history. White campion (*Silene latifolia*) has been chosen as the material for isolation of cytogenetic and molecular markers on the X and Y chromosomes which enable us to elucidate the evolution of early stages of sex chromosomes and to understand the function of sex chromosomes linked gene complexes.

Flow cytometry and laser beam microdissection were used to isolate the sex chromosomes and to construct chromosome specific libraries. We have also isolated six sequences (DD3, DD7, DD14, DD26, DD44, DD51) by differential display method. We supposed that these sequences can play a role during male phenotype expression. All clones were localised in the genome of *Silene latifolia* applying PCR on sorted chromosomes. We have used RT-PCR and Northern blot analysis to verify expression of cloned sequences. Only two of them (DD3, DD44) revealed differences in expression pattern between male and female plants and both were localised on the sex chromosomes. One of the DD3 alleles was mapped on the Y chromosome and we have proved that this allele was expressed there. DD44 was localised exclusively on the sex chromosomes and was expressed both on the X and Y chromosomes. The DD44 sequence was also shown on *S. latifolia* chromosomes using *in situ* hybridisation (FISH). The probe for FISH was isolated by screening a genomic phage library (collaboration with Dr. Sarah Grant, University of North Carolina). The insert from a positive phage (16 kbp long) was recloned to pBR322 plasmid and labelled by Cy3-dUTP. DD44 was localised to the distal regions of longer arms of both the sex chromosomes, X and Y. The results are consistent with the segregation analysis demonstrating the presence of the X and Y linked copies in the *S. latifolia* genome. These new markers enable us to study evolutionary processes which led to the occurrence of the sex chromosomes in different species of the genus *Silene*.

This research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grants 522/02/1485 and 522/03/0354)

ACCUMULATION OF FGF-2 IN CD34+ CELLS FROM CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS: RELATIONSHIP WITH MALIGNANT PHENOTYPE

Jitka Faitova¹, Dana Dvorakova, Jiri Mayer, Ales Hampl, Petr Dvorak

¹*Department of Molecular Embryology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science of the Czech Republic, Zemedelska 1, Brno, Czech Republic*

Objectives. It has been demonstrated that CD34+ chronic myeloid leukemia (CML) cells display increased resistance to drug-induced apoptosis and arrested differentiation. However, the mechanisms by which this is achieved remain largely unexplained. We tested the

hypothesis that fibroblast growth factor-2 (FGF-2), which has been proposed as a modulator of apoptosis, growth and differentiation in various cell types, could play the similar role in CML progenitors.

Material and Methods. We used primary CD34+ progenitor cells isolated from chronic phase CML patients to analyse the expression of molecular mass variants of FGF-2, release of FGF-2 into culture media and expression of FGF-2-interacting proteins. Possible autocrine activity of FGF-2 was tested in the colony forming assay either with FGF-2-neutralizing antibody or with exogenous FGF-2.

Results. We revealed that primary CML CD34+ progenitor cells obtained from CML patients show strongly elevated levels of both low- and high-molecular mass isoforms of FGF-2 and simultaneously express anti-apoptotic FGF-2-interacting factor (FIF). Significant portion of FGF-2 associates with FIF and is accumulated in cell nuclei, suggesting a possible involvement in intracrine mechanism of resistance of CML CD34+ cells to anti-leukemic drugs, aberrant cycling and differentiation. We further showed that CML CD34+ cells release small amount of low-molecular mass FGF-2 into culture media. However, disruption of autocrine FGF-2 signaling pathway by neutralizing anti-FGF-2 antibody does not affect colony-forming capacity and/or differentiation of CML CD34+ cells. Notably, treatment of CD34+ cells with exogenous FGF-2 at higher concentration results in significant increase of number of CFU-E and BFU-E colonies.

Conclusion. Our findings indicate that endogenously synthesized FGF-2 may participate in maintenance of malignant phenotype of chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitor cells by intracrine rather than autocrine signaling pathway. Since this raises the possibility that nuclear FGF-2 may play some specific role in CML, the activity of nuclearly localized high-molecular mass FGF-2 is being currently investigated using antisense morpholino oligodeoxynucleotides.

NEW PRINCIPLE OF THE DIRECT REAL-TIME MONITORING OF INTERACTIONS BETWEEN CHOLINESTERASE AND ITS INHIBITORS USING PIEZOELECTRIC BIOSENSOR

Jan Halánek^{1,2}, Alexander Makower¹, Petr Skládal², Frank Kernchen³ and Frieder W. Scheller¹

¹ *Department of Analytical Biochemistry, Institute of Molecular Physiology and Biochemistry, University of Potsdam, Golm, Germany*

² *Department of Biochemistry, Masaryk University Brno, Czech Republic*

³ *Biosyntan, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany*

The piezoelectric quartz sensor was used for monitoring of interactions between cholinesterase and its inhibitors – organophosphates (OPs). OPs represent very strong cholinesterase inhibitors widely used in agriculture as insecticides due to their high efficiency, low bioaccumulation, and negligible accumulation in the environment. Some agile organophosphorus are extremely toxic compounds, widely used as warfare nerve agents present in army forces worldwide and especially in the recent years, the evident effort of totalitarian and militant regimes to own chemical weapons becomes a real danger. In this presentation, a novel approach to bioanalytical assay of organophosphates will be introduced.

At first, the conjugate of N-mercaptopundecanoic acid (MUA) with N α ,N α -bis(carboxymethyl)-L-Lysine (NTA-Lys) was chemisorbed to form a self-assembled monolayer on the surface of the gold electrode of the piezosensor. In the next step, paraoxon-spacer-

hexahistidine conjugate was linked to the MUA-Lys-NTA layer via the chelate complex. The paraoxon-modified surface thus obtained was applied for the binding of human butyrylcholinesterase. Regeneration of the sensing surface was achieved by splitting the chelate complex with EDTA and depositing a fresh layer of Ni²⁺ followed by addition of the paraoxon-spacer-hexahistidine. In the presence of free inhibitors, binding of BChE to the surface-bound paraoxon was decreased.

In this way, a competitive affinity assay for organophosphorus compounds was developed. The limit of detection for DFP as a model compound was 10 nmol/l (approx. 2 µg/l). All assays were carried out in a flow-through arrangement.

The achieved results should be considered as initial experiments validating the proposed concept. Future research will be directed towards optimization of the proposed method in order to achieve higher sensitivity and shorter time of analysis. The proposed experiments with different pesticides and different measuring setups will be continued. This will allow the development of a rapid screening method for different inhibitors, which will be evaluated on real samples. This new concept seems suitable for constructing biosensors for the group-specific detection of cholinesterase-inhibiting substances like insecticides in the field.

ECTOPIC OVER-EXPRESSION OF A MAIZE β -GLUCOSIDASE MAY DISRUPT CYTOKININ HOMEOSTASIS IN TRANSGENIC TOBACCO

Nagavalli S. Kiran¹, Alena Reková¹, Martina Válková¹, Jiří Málbeck³ and Břetislav Brzobohatý^{1,2}

¹*Department of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, CZ-61137 Brno, Czech Republic.*

²*Institute of Biophysics AS ČR, Královopolská 135, CZ-61265, Brno.*

³*Institute of Experimental Botany, AS CR, Rozvojová 135, CZ-16502 Prague, Czech Republic.*

Transgenic tobacco over-expressing a maize β -glucosidase, Zm-p60.1, capable of releasing free, active cytokinins from their inactive O- and N3-glucoside conjugates was grown in the presence of exogenous zeatin and the responses analysed. Two-week-old seedlings were indistinguishable from wild-type and the cytokinin inhibition of root growth was already apparent.

However, between 21 and 28 days after sowing (DAS), seedlings expressing Zm-p60.1 that were grown under short-day conditions showed an increase in fresh weight manifested as ectopic growths at the base of the hypocotyl. In several cases fully differentiated true leaves were also to be seen at 28 DAS. The development of ectopic structures seems to be correlated with the presence of the β -glucosidase enzyme as demonstrated by histochemical staining and RT-PCR analyses.

We are in the process of analysing whether the ectopic expression of this β -glucosidase disrupts the metabolic homeostasis between free and glucoside forms of cytokinin, and the first results from these experiments will be presented.

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Czech Republic (No. MSM 143100008), the Grant Agency of the Czech Republic (No. GACR 206/96/K188), the Academy of Sciences, Czech Republic (Z 5004920) and the Grant Agency of the Academy of Sciences (No. IAA 5004001)

A PUTATIVE SENSOR HISTIDINE KINASE CKII IS INVOLVED IN *ARABIDOPSIS*
FEMALE GAMETOPHYTE DEVELOPMENT.
DOMNĚLÁ SENZOROVÁ HISTIDINKINÁZA CKII JE NEZBYTNÁ PRO VÝVOJ
SAMIČÍHO GAMETOFYTU U *ARABIDOPSIS*.

Jan Hejátko^{1,2,3}, Markéta Pernisová², Tinka Eneva⁴, Klaus Palme^{3,4} and Břetislav
Brzobohatý^{1,2}

1 Institute of Biophysics AS CR, Královopolská 135, CZ-61265, Brno, Czech Republic

*2 Dept. of Functional Genomics and Proteomics, Masaryk University, Kotlářská 2, CZ-
61137, Brno, Czech Republic*

*3 Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft, Carl-von-Linné Weg 10, D-
50829, Köln, Germany*

*4 Institut für Biologie II, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Schänzlestr. 1, 79104
Freiburg*

Embryo sac formation is a fundamental step in plant sexual reproduction. However, the key players driving female gametophyte development remain elusive. We present data indicating that a two-component sensor histidine kinase CKII, originally implicated in cytokinin perception, is required for completion of megagametogenesis in *Arabidopsis*.

We isolated a recessive loss-of-function mutation in *CKII* resulting from an insertion of *En-1* transposon into the *CKII* coding sequence. The mutant *ckil-i* allele could not be transmitted through the female germ line, and conferred partial lethality on the male gametophyte. Confocal laser scanning microscopy identified a block in megagametogenesis characterised by the abortion of the central vacuole in mutant embryo sacs and degradation of the developing female gametophyte after completion of all mitotic divisions. Two independent stable alleles and one revertant wild type allele resulting from *En-1* excision confirmed unambiguously a causal link between the *ckil-i* and the phenotype. *In situ* localisation of *CKII* mRNA and histochemical analysis of stable transformants harbouring the *uidA* gene under the control of *CKII* promoter revealed that *CKII* expression starts at the very beginning of female gametophyte development and continues till fertilization. This might suggest that susceptibility of the developing embryo sac for a signal recognized by CKII is maintained throughout megagametogenesis. Further, transient endosperm-specific *CKII* expression early after fertilization was detected.

The results indicate an as yet unrecognised role of a two-component signalling system during female gametophyte development in *Arabidopsis* and provide the first evidence that gametophytic expression of a sensor-like molecule is essential for specific processes during megagametogenesis.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (grants nos. VS96096 and MSM143100008, by the INCO-Copernicus Program (grant no. ERB3512-PL966135), the DFG (SPP "Molekulare Analyse der Phytohormonwirkung"), and the European Communities Biotech Program (QLRT-2000-0020). J.H. was supported by DAAD.

PLANT SEX CHROMOSOMES EVOLUTION EVOLUCE POHLAVNÍCH CHROMOZÓMŮ U ROSTLIN

Martina Lengerova, Eduard Kejnovsky, Roman Hobza and Boris Vyskot
Institute of Biophysics AS CR, Kralovopolska 135, 612 65 Brno, Czech Republic

Silene latifolia Poiret is a dioecious plant with heteromorphic sex chromosomes. Contrary to human sex chromosomes where the Y chromosome possesses a large degree of degeneration, the sex chromosomes in the genus *Silene* evolved rather recently (16 mya) which makes it a suitable model to study early stages of sex chromosomes evolution. In these first stages evolutionary mechanisms like accumulation of repetitive sequences and transposable elements might have been expected. Contrary to another dioecious plant model *Rumex acetosa* L. no Y chromosomes specific repetitive sequences have been isolated yet. We used *S. latifolia* female genomic DNA as the probe for colony hybridization to select BAC clones with a low content of general repetitive sequences. Selected clones gave discrete FISH signals on one or more autosome pairs and some of them hybridized preferentially on the Y chromosome, which indicated the accumulation of repetitive sequence. We subcloned these BAC clones and used differential hybridization with male and female genomic DNA to select the ones containing the repetitive motif. The main goal of this study is to find sequences specific for the sex chromosomes and use them as FISH probes on related hermaphroditic *Silene species*. These data will enable to prove the theory that sex chromosomes in the genus *Silene* evolved from single a autosome pair and to identify this ancestor pair.

This research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grants 204/02/0417 and 521/02/0427)

ERGOSTEROL AS SIGNAL MOLECULE OF PLANT DEFENCE REACTION

Tomáš Kašparovský¹, Marie-Louise Milat², Jean-Pierre Blein², Ladislav Havel³, Vladimír Mikeš¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic. ²Unité associée INRA/Université de Bourgogne 692, Laboratoire de Phytopharmacie et de Biochimie des Interactions Cellulaires, Dijon, France. ⁴Department of Botany and Plants Physiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic.

The molecular mechanism of the interaction between hosts and pathogens is a subject of many studies. Usually, the products of pathogen avirulence genes named elicitors bind to receptors and trigger a signal transduction cascade. The changes of membrane permeability leading to the influx of Ca²⁺ and H⁺ and the efflux of Cl⁻ and K⁺ followed by the oxidative burst, synthesis of phytoalexins and the activation of defence genes constitute the response of plants to microorganism attacks. The elicitors are oligosaccharides, peptides or low-molecular substances released from hyphen or plant cell walls. Concerning lipids, Granado et al. (1995) previously reported that a specific interaction of ergosterol from *Cladosporium fulvum* with tomato cells induces extracellular pH changes. Ergosterol is the principal component of the cell wall of fungi. Variety of substances with antifungal properties block ergosterol biosynthesis

We have observed, that ergosterol interacts with tobacco suspension cells and trigger pH changes of extracellular medium, oxidative burst and synthesis of phytoalexins. Compared with the responses induced by cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora* sp., oxidative burst, ΔpH and phytoalexin accumulation were weaker with ergosterol. Cryptogein stimulated an apparent continuous uptake of external calcium within 40 min, whereas no net uptake of external calcium occurred upon the addition of ergosterol. However, the elicitation with either cryptogein or ergosterol resulted in an increase of the fluorescence of calcium green 1 in cytosol of epidermal tobacco cells. The use of several inhibitors of calcium channels (La³⁺, TMB-8, verapamil, ruthenium red, nifedipine) and a protein-kinase inhibitors (staurosporin, NPC-15437, H-89) suggests that the elicitation with ergosterol includes the mobilization of internal calcium stores in vacuoles and PKC. PLC inhibitors (U73122, neomycin) were ineffective, so the signal pathway probably includes Ca²⁺-dependent PKC. Elicitation by ergosterol does not induce cell death and plant resistance.

Granado J., Felix G. and Boller T. (1995). *Plant Physiol.* 107: 485-490.

EXPRESSE A PURIFIKACE PUTATIVNÍ MYKOBAKTERIÁLNÍ
GLYKOSYLTRANSFERASY RV3782 PRO KRYSTALOGRAFICKÉ STUDIE
EXPRESSION AND PURIFICATION OF PUTATIVE MYCOBACTERIAL
GLYCOSYLTRANSFERASE RV3782 FOR CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES

Nikola Kostlánová^a, Michaela Wimmerová^{a,b}, Anne Imberty^c

^aNational Centre for Biomolecular Research & ^bDepartment of Biochemistry, Masaryk
University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: nikol@chemi.muni.cz;

^cCentre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, Grenoble, France

A putative rhamnosyltransferase Rv3782 belongs to a group of glycosyltransferases (GTs) that are responsible for biosynthesis of cell wall envelope of *Mycobacterium tuberculosis*. Mycobacterial cell wall contains some unique sugar components that play a crucial role in host-pathogen interaction and is responsible for high pathogen resistance against common therapeutic agents. Thus these GTs are interesting as potential drug targets.

In previous part of our research we selected some genes of putative GTs (using various bioinformatics tools applied to *M. tuberculosis* H37Rv genome sequence) that should be mostly of interest.

At present study we have been focused on structural analysis of Rv3782. The main problem is to obtain a sufficient amount of soluble and pure protein for crystallization studies. Most of the expressed protein forms inclusion bodies, probably because of its toxicity for host cells, and there are additional losses caused by high GTs hydrophobicity that complicates its purification.

To optimize preparation of soluble and pure protein we have been testing different expression systems. Gene rv3782 has been cloned into five expression vectors to obtain different recombinant proteins. Finally, we prepared two types of Rv3782 fusion proteins, one with N-terminal thioredoxine protein in combination with His-tag (Trx-Rv3782) and the second in two variants with maltose binding protein (MBP-Xa-Rv3782, MBP-E-Rv3782), and two simpler systems, protein Rv3782 alone (Rv3782) and protein with N-terminal His-tag (Rv3782-His).

The most favorable approach becomes expression of Rv3782 fused with MBP, because this system provides a high amount of expressed protein in soluble form and there are not difficulties with its purification, in contrast to other used systems.

HLEDÁNÍ ROSTLINNÝCH TELOMERVAZEBNÝCH PROTEINŮ PROSTŘEDNICTVÍM GENOMICKÉHO A PROTEOMICKÉHO PŘÍSTUPU SEARCHING FOR PLANT TELOMERE-BINDING PROTEINS USING GENOMIC AND PROTEOMIC APPROACHES

Milan Kuchař¹, Mirka Horáková¹, Dagmar Zachová¹, Jiří Fajkus^{1,2}

¹*Department of Functional Genomics and Proteomics, Masaryk University Brno, Kotlářská 2,
CZ-61137 Brno, Czech Republic*

²*Institute of Biophysics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská
135, CZ-61265 Brno, Czech Republic*

Telomere-binding proteins participate in forming functional structure of chromosome ends and regulating telomerase action.

Two proteins, ATTB1 (acc. nos. T46051 (protein database), GI:638639 (nucleotide database)) and ATTB2 (BAB08466, GI:9757879) from *Arabidopsis thaliana*, were found in the database on the basis of amino acid sequence similarity with telomere-binding protein PcMyb1 (acc. No. T15038) from *Petroselinum crispum*. Both of the proteins were expressed in various *A. thaliana* tissues and as the PcMyb2 contain Myb-like domain at the N-terminus which enables the double-stranded DNA binding and additionally a histone H1/H5-like DNA-binding domain in the middle of the protein sequence. The cDNAs of ATTB1 and ATTB2 were cloned and the experiments carried out in *Saccharomyces cerevisiae* using the two-hybrid system showed interaction between the two proteins and self-interaction of each of the proteins. No interaction was observed between one of the two proteins and the *Arabidopsis* telomerase reverse transcriptase catalytic subunit TERT (acc. No. AF172097).

Other two new proteins AtPot1 (acc. No. NP_178592) and AtPot2 (acc. No. P_196249) from *Arabidopsis thaliana* containing Pot-like motif were found on the basis of amino acid sequence comparison with TEBP alfa (acc. No. P29549) from *Oxytricha nova* which binds the single-stranded DNA of telomere overhangs. The AtPot1 cDNA was amplified from total RNA from *A. thaliana* seedlings, cloned and expressed in *E. coli* for subsequent analysis. AtPot2 mRNA was detected only as rearranged and alternatively spliced product in the various tissue types.

The yeast forward two hybrid assays were performed to find proteins interacting with telomerase catalytic subunit from *Arabidopsis thaliana*. Forty yeast colonies were selected as positive for the interaction. Their analysis is in progress.

Our research is supported by GACR 204/02/0027 and MSM143100008.

DESIGN OF SPECIFIC PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF *ARMILLARIA* SPECIES

Lochman J.¹, Šerý O.², Hamanová M.¹, Jankovský L.³, Mikeš V.¹

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, 61137 Brno, Czech Republic.*

²*Department of comparative animal physiology and general zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, 61137 Brno, Czech Republic.*

³*Department of Forest Protection and Hunting, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic.*

The genus *Armillaria* belongs to basidiomycetes and has been known to induce root rot disease and to cause extensive economic losses to a forest crop. Individual species have different pathogenic behaviour and thus the forest management necessitates confirming the presence of virulent *Armillaria* species in the forest. More than 40 isolates containing six species of *Armillaria* from the collections have been analysed (*A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. mellea*, *A. ostoyae* and *A. tabescens*) by using the PCR of the internal transcribed spacer region (ITS). To specific amplification of ITS region of genus *Armillaria* the primers Arm1 and Arm2 were designed. The amplicates were further analysed by RFLP (*AluI*, *HinI* and *MboI*) and the restriction fragments were separated by IE- HPLC on TSKgel DEAE-NPR column (Supelco).

The primers Arm1 and Arm2 enabled to amplify the part of the ITS region of all *Armillaria* species and no amplicates were observed with other fungi. The restriction analysis of amplicate by restriction endonucleases *HinI* allowed discrimination of all six investigated species. The resolution achieved on the HPLC system was about the 5% of fragments length. The HPLC system was also able to quantify the amount of DNA, so we were able to clearly identify some heterozygote, which were consequently sequenced.

ZAVEDENÍ A APLIKACE METODIKY MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ DETEKCE MUTACÍ V GENU SCN5A U ČLOVĚKA IMPLEMENTATION AND APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC METHODOLOGY FOR DETECTION OF MUTATIONS IN HUMAN SCN5A GENE

Ivo Papoušek

Katedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká Fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Long QT syndrome (LQTS) is a serious hereditary cardiac disorder, associated with ventricular fibrillations, tachyarrhythmias or syncope, which can eventually lead to death. LQTS is therefore sometimes called sudden death syndrome. Characteristic clinical manifestations include prolonged QT interval in electrocardiogram (EKG), sudden loss of consciousness and heart attacks, particularly in situations with acute physical or psychological stress.

At least five genes associated with long QT syndrome were found so far, all of them encoding structural or regulative subunits of membrane ion channels in cardiomyocytes. LQTS may be judged as group of diseases with similar phenotype. LQTS can also have non-genetic causes.

Main diagnostic criterion of LQTS is the prolonged QT interval in EKG. This criterion is not completely reliable. Family anamnesis should be considered, particularly eventual

presence of cardiac disorders. Genetic diagnostics by means of polymerase chain reaction (PCR) and successive methods are implemented in most laboratories.

Sodium ion channel encoded by SCN5A gene is responsible for the rapid influx of sodium ions which initiate the upstroke of the action potential in heart. Mutations in SCN5A gene may cause repolarization disorders in myokard cell membrane and therefore susceptibility to cardiac arrhythmias.

Aim of my work was to implementate mutation analysis in human SCN5A gene by PCR amplification and subsequent sequencing. Afterwards, mutation screening in patients with presymptomatic diagnosis of LQTS started. Nine segments in five exons of SCN5A gene were chosen for screening. From total of 28 exons only those were selected, in which a mutation causing LQTS has been previously found and described

Analysis of exon 18 has shown in all patients a distinct position of single nucleotide in comparison to the sequence listed in databasis (C3402/C3414). We assume it is an error in standard sequence entry rather than a mutation causing LQTS. In exon 28 a single nucleotide polymorphism (SNP) C5607T was found. It was previously described in American population. This polymorphism doesn't change the aminoacid and therefore can't be the cause of LQTS in tested patients. In six patients, heterozygous state 5607C/T was found, five other exhibit homozygous state 5607T. Only one patient has shown a standard homozygote state 5607C.

So far, no mutation causing LQTS was found.

SEROLOGICAL STUDY OF DOGS FOR THE PRESENCE OF ANTI-BORRELIA
BURGDORFERI S.L. ANTIBODIES
SEROLOGICKÁ STUDIE U PSŮ NA PŘÍTOMNOST ANTI-BORRELIOVÝCH
PROTILÁTEK

Pejchalová K., Žáková A., ¹Schánilec, P.

*Department of Comparative Physiology and General Biology, Faculty of Natural Sciences,
Masaryk University, Brno, Czech Republic*

¹ *Clinic of companion animal diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Brno, Czech Republic*

Lyme borreliosis is a zoonotic disease, evoked by spirochete *Borrelia burgdorferi*. From the epidemiological point of view, dogs are very important since they are considered a suitable indicator of the spread of human borreliosis. Canine Lyme borreliosis is often diagnosed in North America dogs from endemic regions, but rarely in European dogs, although they may be infested with *Ixodes ricinus*, the main vector of these spirochaete.

The frequency of anti-*Borrelia* antibodies in sera of police dogs from south Bohemia was examined. Blood serum samples of 177 dogs were examined for the presence of anti-*Borrelia* IgG antibodies by indirect ELISA and compared to positive and negative samples. Specific anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. antibodies were detected in 11 cases of 177 (6,2%). Two antigens *Borrelia burgdorferi* s.l. (*Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*) were compared by this method on the same sample. The total of 6 (3.4%) were positive for anti-*Borrelia afzelii* antibodies and 8 (4.5%) were positive for anti-*Borrelia garinii* antibodies. 3 cases of all were positive for both antibodies.

This work was partially supported of CEZ: J 07/98: 143 1000 08

IDENTIFICATION OF THE CATALYTIC TRIAD OF DEHALOGENASE DhmA IDENTIFIKACE KATALYTICKÉ TRIÁDY DEHALOGENASY DhmA

Pavlová M.¹, Jesenská A.¹, Nagata Y.² and Damborský J.¹

¹National Centre for Biomolecular research, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, ²Department of Environmental Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai, 980-8577, Japan

Haloalkane dehalogenases are hydrolytic enzymes that belong to the α/β -hydrolase superfamily. They catalyze conversion of halogenated aliphatic hydrocarbons to the corresponding alcohols. Four different haloalkane dehalogenases have been described in the literature until today: Dh1A enzyme from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [1], DhaA enzyme from *Rhodococcus* sp. [2-5] and *Pseudomonas pavonaceae* 170 [6], LinB enzyme from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 [7] and DhmA enzyme from *Mycobacterium avium* N85 [8]. This contribution focuses on the most recently member of the haloalkane dehalogenase family - enzyme DhmA.

DhmA has a broad substrate specificity and good activity with the priority pollutant 1,2-dichloroethane. DhmA overexpressed in *Escherichia coli* GI724 showed low expression and low stability [8]. 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.

Site-directed mutagenesis and the newly developed expression system were used for identification of the catalytic residues of DhmA. Putative catalytic triad (D1423, D250 and H279) and halide-stabilizing residue (W124) were proposed from the sequence analysis and theoretical 3D model of DhmA. Four mutants were constructed by site-directed mutagenesis: D123A, W124L, D250A and H279A, overexpressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. All mutant proteins were inactive confirming essential role of the catalytic residues. Based on this result, detailed reaction mechanism of DhmA was proposed.

- 1 Keuning, S., Janssen, D.B., and Witholt, B., J. Bacteriol., 163 (1985) 635-639.
- 2 Yokota, T., Omori, T., and Kodama, T., J. Bacteriol., 169 (1987) 4049-4054.
- 3 Scholtz, R., Leisinger, T., Suter, F., and Cook, A.M., J. Bacteriol., 169 (1987) 5016.
- 4 Janssen, D.B., Gerritse, J., Brackman, J., Kalk, C., Jager, D., and Witholt, B., Eur. J. Biochem., 171 (1988) 67-92.
- 5 Sallis, P.J., Armfield, S.J., Bull, A.T., and Hardman, D.J., J. Gen. Microbiol., 136 (1990) 115-120.
- 6 Poelarends, G.J., Wilkens, M., Larkin, M.J., vanElsas, J.D., and Janssen, D.B., Appl. Environ. Microbiol., 64 (1998) 2931-2936.
- 7 Nagata, Y., Miyauchi, K., Damborsky, J., Manova, K., Ansorgova, A., and Takagi, M., Appl. Environ. Microbiol., 63 (1997) 3707-3710.
- 8 Jesenska, A., Bartos, M., Czernekova, V., Rychlik, I., Pavlik, I., and Damborsky, J., Appl. Environ. Microbiol., 68 (2002) 3724-3730.

EXAMINATION OF BLOOD FROM WILD-LIVING RODENTS FOR THE PRESENCE
OF ANTIBORRELIAN ANTIBODIES
VYŠETŘENÍ KRVE DIVOCE ŽIJÍCÍCH HLODAVCŮ NA PŘÍTOMNOST
ANTIBORRELIOVÝCH PROTILÁTEK

Vostal K., Žáková A.
*Department of Comparative Physiology and General Biology,
Faculty of Natural Sciences, Masaryk University,
Brno, Czech Republic*

The purpose of study was to find the degree of antibody response on infection of Lyme disease caused by the pathogenic spirochaete *Borrelia burgdorferi*.

A total of 202 wild-living rodents was trapped in selected localities in Moravia from the years of 2001(127) to 2002(75). All of these individuals were tested for the presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato using indirect ELISA method. Serology was performed by testing for IgG antibodies against *B. afzelii*, as one of the most presented genospecies of *B. b. s. l.* in wild small mammals in the Czech republic. The results were sorted by year of animal trapping, gender and species of examined rodents.

1. In both years 45,0 % of individuals were positive for the presence of antiborrelial antibodies, there were 48,0 % of positive males, 42,0 % of positive females. The most positivized species were *Apodemus sylvaticus* (52,4 %) and *Apodemus flavicollis* (47,3 %).

2. In the year of 2001 the positivity of trapped rodents was 59,1 %, positivity of males was 59,7 %, positivity of females 58,3 %, the most positive species was *A. flavicollis* (65,3 %).

3. In the year of 2002 the positivity of all individuals was 21,3 %, there were 25,7 % of positive males and 17,5 % of positive females. The most positive species was *A. flavicollis* (25,6 %).

This work was partially supported of CEZ: J 07/98: 143100010, 143 100008

MUTATION ANALYSIS AT CHROMOSOMAL REGION 11Q22-Q23 IN BREAST
CANCER
MUTAČNÍ ANALÝZA CHROMOZOMÁLNÍ OBLASTI 11Q22-Q23 U NÁDORU PRSU

Daria Pospíšilová
*Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk
University, Komenského náměstí 2, Brno, Czech Republic*

Breast cancer is the most frequent malignancy in women in the world, with a cumulative lifetime risk estimated to be 10-12%. Cytogenic and molecular genetic analyses of breast tumor cells suggest that the development of human breast cancer involves the accumulation of alterations in genes which normally serve to control growth and differentiation. One type of this alternation is loss of heterozygosity (LOH), which is detected in many cases of breast cancer. LOH of tumor suppressor genes are associated with cancerogenesis. Several studies have indicated that the genes harbors on long arm of chromosome 11, could be deleted during tumorigenesis. Deletions at 11q23 were detected in variety of human neoplasm, including

breast. In this region can be harbor at least one tumor suppressor gene, which is inactivated during the establishment or progression of several types of tumors.

Evidence for the existence of a tumor suppressor gene(s) in this region came from the observation that tumorigenicity of the MCF-7 cell line is inhibited by the introduction of the segment 11q13-q23 of the normal human chromosome 11.

One of the candidate gene is A-T (ataxia-telangiectasia) gene, located at chromosomal region 11q22-q23. Patients carrying two mutant alleles (ATM) and affected by A-T a 100-fold higher risk of developing cancer, mostly leukemias and lymphomas, than unaffected age-matched subjects. Heterozygous A-T carriers have a 3,1 and 2,3 (females and males) fold increased risk of cancer, in particular breast cancer, compared to the normal population. It is estimated, that as much as 8% of sporadic breast cancer could possibly develop in carriers of ATM gene predisposing mutations. It seems that inherited mutations in ATM gene are responsible for a certain proportion of breast cancer cases, and that LOH of other allele will unmask such a recessive mutation.

The ATM gene spans ~ 150kb genomic sequence and contains 66 exons. It is expressed as a 12 kb transcript in all tissues and cell types. This gene is implicated in cell cycle regulation, control of telomere length, and response to DNA damage. The enzyme cooperates with many protein in cell. Its inactivation could be influenced repair process in cell. We interested in catalytic domain as a candidate region for inactivation of kinase activity. This part of protein corresponds with last 16 exons on DNA of this gene. Tumor DNA from 42 patients with primary breast cancer were studied. This samples were chosen after analyzed for loss of one allele (part of chromosome) in region 11q22-23 by methods which detected polymorphic markers on pair of chromosomes. For LOH detection we used SSCP (single-strand conformation polymorphism) and silver staining method. We did not find any unique SSCP variants.

THE COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF BACTERIAL DNA ISOLATION FROM *Lactococcus lactis* AND ITS APPLICATION IN PCR-BASED METHODS

J. Prodělalová, A. Španová, B. Rittich

Department of Microbiology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdeho 14, 602 00 Brno

PCR and related techniques can be affected with various components used in procedure of DNA isolation and it can be the cause of failure in PCR. Also the purity and degree of degradation of template DNA can influence a result of polymerase chain reaction.

The aim of this work was to compare the various methods of template DNA isolation and the suitability of the tested methods for use in PCR identification of *Lactococcus lactis* ssp.

Template DNA isolated from *Lactococcus lactis* was used in PCR. *Lactococcus lactis* are Gram-positive bacteria widely used in the manufacture of cheese and other fermented dairy products. Bacterial strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 1887^T, *L. lactis* subsp. *lactis* CCM 1881, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCM 2106 and *L. lactis* subsp. *hordniae* CCM 4541^T were used in this work. Various methods were used for isolation of chromosomal DNA: 1. cell lysis using sucrose and lysozyme followed by phenol-chloroform purification, 2. cell lysis using sucrose, lysozyme and CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 3. extraction by chelex (iminodiacetic acid) ionic resin, 4. preparation of crude cell lysates by boiling and using proteinase K, 5. treatment with proteinase K and nonionic detergents (Tween 20 and Triton X-100). Obtained chromosomal DNA was used as a template for PCR with species-

specific primers PALA 4 and PALA 14 (Buist et al., 1995). Amplified fragments (1 131 bp) were run on 1.2 % agarose gel and were stained with ethidium bromide. Amplified PCR products were detected using template DNA prepared by methods 1-4. No PCR product was obtained using template DNA prepared by method 5. The subspecies of *Lactococcus lactis* were distinguished using rep-PCR typing. Primer LL-Rep1 (Urbach et al., 1998) was used in amplification reaction. Best results were obtained with template DNA prepared according to method 1.

1. Buist G, Kok J, Leenhouts JK, Dabrowska M, Venema G, Haandrikman A . (1995) J. Bacteriol. 177: 1554-1563.
2. Urbach E, Schindler C, Giovannoni SJ (1998) Microbiol. Lett. 162: 111-115.

CHARAKTERIZACE DVOU MYB-LIKE PROTEINŮ Z *ARABIDOPSIS THALIANA*,
KTERÉ VZKAZUJÍ AFINITU K TELOMERICKÝM SEKVENCÍM
CHARACTERISATION OF TWO *ARABIDOPSIS THALIANA* MYB-LIKE PROTEINS
SHOWING AFFINITY TO TELOMERIC DNA SEQUENCE

Petra Schrupfová¹, Milan Kuchař¹, Gabriela Miková¹, Lenka Skříšovská¹, Tatiana Kubičárová^{1,2}, Lumír Krejčí¹, Zuzana Kunická¹ and Jiří Fajkus^{1,2,*}

¹ Department of Functional Genomics and Proteomics, Masaryk University Brno, Kotlářská 2, CZ-61137 Brno, Czech Republic

² Institute of Biophysics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

Telomere-binding proteins participate in functional nucleoprotein structure of chromosome ends. Using a genomic approach, two *Arabidopsis thaliana* genes coding for candidate myb-like telomere binding proteins were cloned and expressed in *E. coli*. Both proteins, termed as AtTBP2 (acc. nos. T46051 (protein database), GI:638639 (nucleotide database) 295 AA, 32 kDa, pI 9.53) and AtTBP3 (BAB08466, GI:9757879; 299 AA, 33kDa, pI 9.88), contain a single Myb-like DNA-binding domain at the N-terminus, and a histoneH1/H5-like DNA-binding domain in the middle of the protein sequence. Both proteins are expressed in various *A. thaliana* tissues. Gel-retardation assays showed that each of the two proteins is able to bind G-rich strand and double-stranded DNA of plant telomeric sequence with the affinity proportional to a number of telomeric repeats. Substrates bearing a non-telomeric DNA sequence positioned between or ahead of 2 telomeric repeats were bound at lower efficiency compared to purely telomeric oligonucleotides of comparable total length. The ability to bind variant telomere sequences decreased in accordance to the extent of a sequence divergence with respect to the *A. thaliana* telomeric DNA. A modified telomeric oligonucleotide unable to form G-quartet structure due to substitution of all guanines for 7-deaza-8-aza-G (pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) (PPG) showed a lower binding efficiency when competed by unmodified telomeric oligonucleotide. This suggests that although G-quartet formation is not essential for binding, substitution still influences its binding. None of the proteins alone or their mixture affects telomerase activity *in vitro*.

The research is supported by GACR 204/02/0027 and MSM 143100008

RYCHLÁ EVOLUCE RODIČOVSKÝCH rDNA V ALLOTETRAPLOIDNÍ LINII
SYNTEKICKÉHO TABÁKU
RAPID EVOLUTION OF PARENTAL rDNA IN A SYNTHETIC TOBACCO
ALLOTETRAPLOID LINE

Kamila Skalická¹, K. Yoong Lim², Roman Matyášek¹, Blažena Koukalová¹, Andrew R. Leitch² & Aleš Kovařík¹

¹Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, 61265 Brno, Czech Republic

e-mail: skalicka@ibp.cz

²School of Biological Sciences, Queen Mary University of London, E1 4NS, UK

Unidirectional gene conversion of rDNA units has occurred in the evolution of natural tobacco (*Nicotiana tabacum*). In this paper we use synthetic tobacco line, Th37, 4n (*N. sylvestris* x *N. tomentosiformis*), to study early rDNA evolution associated with allopolyploidy. At least three classes of newly amplified rDNA unit variants were identified (17/20 plants) and their presence was often accompanied by the complete elimination of ~2000 copies of *N. tomentosiformis* donated rDNA units (15/20 plants). Novel rDNA units were of *N. tomentosiformis*-type and contained rearranged subrepeats in the intergenic spacer. The maternal *N. sylvestris*-derived units were unchanged except for some alteration in the ratio of individual gene family members. A cytogenetic analysis revealed rDNA sites on *N. sylvestris*-derived chromosomes S10, S11 and S12 and *N. tomentosiformis*-derived chromosomes T3 and in some cases T4. An rDNA locus does not occur on *N. tomentosiformis* chromosome 4. The locus on chromosome T4 of some hybrids correlates with the occurrence of the novel units that probably amplified at the locus. Combined with an analysis of tobacco cultivars the data indicate an initial burst of rDNA evolution associated with allopolyploidy followed by slower process leading towards reduced complexity and decreased numbers of rDNA variants.

Key words: evolution - gene conversion - ribosomal RNA genes - synthetic allopolyploids - tobacco

RESEARCH AND DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF IN SITU TECHNIQUES IN
TELOMERE BIOLOGY
VÝZKUMNÉ A DIAGNOSTICKÉ APLIKACE TECHNIK IN SITU V BIOLOGII
TELOMER

Marie Skleničková², Martina Dvořáčková, Jiří Fajkus^{1, 2}

¹) Department of Functional Genomics and Proteomics, Masaryk University Brno, Kotlářská 2, CZ-611 37 Brno, Czech Republic

²) Institute of Biophysics of the Academy of Science of The Czech Republic, Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic

Stable telomere maintenance is essential for indefinite cellular proliferation of germline and tumour cells. In most cases, telomere synthesis is performed by nucleoprotein enzyme complex of telomerase. Rarely, telomeres may also be maintained via alternative (recombination-based) mechanism. While telomerase action in human tumour cells results in stabilisation of telomeres shortened to their critical minimum length (2-5 kb), alternative

lengthening results in long, sequentially heterogeneous telomeres (10-50 kb). Consequently analysis of telomere lengths enables to distinguish between those two mechanisms.

There are several in situ techniques that can be used for the analysis of telomeres. Fluorescent in situ hybridisation (FISH) on metaphase spreads as well as on extended DNA fibres (fiber-FISH), FISH with using PNA telomere probes and Primed in situ labeling (PRINS) will be shown and described. The availability of these techniques for analysis of telomeres and subtelomeres on human cancer cells, especially on multiple myeloma cells, will be discussed.

The research is supported by: IGA MZCR NC 7043-3, GA AVCR S504010, MSM 143100008

DEXAMETHASONEM INDUKOVATELNÝ SYSTÉM AKTIVACE TRANSKRIPCE
TRANSGENŮ U TABÁKU
DEXAMETHASONE-INDUCIBLE TRANSCRIPTION ACTIVATION SYSTEM FOR
TRANSGENE EXPRESSION IN TOBACCO

Markéta Šámalová, Ian Moore, Todor Genkov, Jiří Malbeck, Břetislav Brzobohatý
Institute of Biophysics AS CR, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic,
Department of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University,
Kotlářská 2, CZ-61137 Brno,
Department of Plant Sciences, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3RB,
UK,
Institute of Experimental Botany AS CR, Rozvojová 135, CZ-16502 Prague, Czech Republic

Transgene expression levels and expression patterns can be adjusted by combining the protein coding region with a suitable promoter. A novel chemical inducible transcription activation system for transgene expression has been tested in tobacco plants. The system is based on an existing pOp/LhG4 system that allows a gene of interest to be activated after a cross between reporter and activator lines. This system has been improved by adding a third domain, the GR domain, into the activator construct. The hormone binding domains of vertebrate steroid receptors, e.g. the GR domain, are thought to have repressive effects on covalently linked neighboring domains in the absence of their ligands. Therefore, three activator fusions were tested with the GR domain in different positions with respect to LhG4. The *ipt* gene encoding isopentenyltransferase was used as a reporter to find out whether this repressive effect of the GR domain is sufficient for complete inhibition of transcription of physiologically strong transgenes such as the *ipt* gene.

The results confirmed that the fusion with the most desirable characteristics was the fusion with the GR domain fused to the N-terminus of the activator construct. Plants containing this fusion exhibited a low basal level of reporter activity and efficient induction on application of the inducer. The inducible expression was stable over two generations and the activators were normally inheritable according to Mendelian segregation ratio. The system was sensitive to relatively low concentrations of dexamethasone applied. Neither dexamethasone nor LhGR related toxic effects were observed even at the highest concentration of the inducer used. However, the growth and development of tobacco seedlings was delayed due ethanol used as a solvent for dexamethasone. The system could be activated by a variety of methods. The degree of activation of the reporter gene could be

controlled by using defined levels of inducer or different methods of treatment and resulted in various types of phenotype of the plants.

In vitro treatment of tobacco plants overexpressing the *ipt* gene resulted in complete morphological changes of the plants. The plants turned into teratoma-like structures unable to produce roots, eventually. The cytokinin analysis of these plants showed that N-glucosides were increased mostly. In soil, the inductive conditions resulted in a significant reduction of root system and height of the plants, release of axillary buds from dormancy and emergence of numerous lateral shoots, delayed flowering with reduced number of flowers, delayed leaf senescence and chlorotic wrinkled leaves. The non-induced plants exhibited no morphological changes.

This work was supported by grants IAA5004001, KSK5052113 and MSM143100008 from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Academy of Sciences of the Czech Republic and Ministry of Education of the Czech Republic, respectively.

CLASSIFICATION OF SOME LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BEER

Altanzaya Yansanjav¹, Němec Miroslav¹, Ida Hollerová²

¹*Katedra mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, MU, Tvrdého 14, 60200 Brno*

²*Výzkumný Ústav Pivovarský a Sladařský, Lipová 15, 120 44 Praha 2*

Mankind began brewing beer in Mesopotamia around 2000 BC without any knowledge of microorganisms or enzymes. Hop compounds were presumably introduced into beer as a strong preservative of quality. Nevertheless, unwanted microorganisms still grow in beer, including a few lactic acid and gram negative bacteria and wild yeasts which are able to grow even in finished beer with a low concentration of nutrients and oxygen. These contaminants bother consumers and cause economic losses to breweries. The major contaminants of Czech beer are lactic acid bacteria. An API 50 CH kit was used to identify lactic acid bacteria but the method gave doubtful results. Therefore protein profile analysis (SDS-PAGE) and ribotyping were done for accurate identification of strains isolated from beer.

YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*) LEAVES - ANTIOXIDANT AND CYTOPROTECTIVE EFFECT ON RAT HEPATOCYTE.

LISTY JAKONU (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*) - ANTIOXIDAČNÍ A CYTOPROTEKTIVNÍ EFEKT NA POTKANÍ HEPATOCYT.

Kateřina Valentová, Jitka Ulrichová, Vilím Šimánek

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae) is a native Andean plant, cultivated for its tubers throughout South America where they are commonly used by diabetics and persons suffering from digestive problems. The tubers contain 1,2- β -oligofructans as main saccharides, these are used as prebiotics to correct the intestinal flora and absorption of elements such as calcium, magnesium and iron. Treatment for kidney problems and skin-

rejuvenating properties also have been ascribed to this plant. Positive physiological properties have also been attributed to yacon leaves in Brazil in particular, where the dried leaves are used to prepare a medicinal (antidiabetic) tea. However, the only formal studies reported to date on *S. sonchifolius* leaves include isolation of four kaurenoids and four sesquiterpene lactones and investigation of the hypoglycemic activity of an aqueous extract in rats.

In this contribution, we describe:

1. The *in vitro* antioxidant effect of organic (I, II) and aqueous (III, IV) extracts from *Smallanthus sonchifolius* leaves. All the extracts, as well as their main components, demonstrate a strong DPPH and xanthin/xanthinoxidase (X/XOD) generated superoxide radical scavenging effect and protective activity against *tert*-butylhydroperoxide-induced peroxidation of mitochondrial and microsomal membranes from rat liver (Table 1).
2. The effect of extracts (I-IV) on rat hepatocytes isolated by two-step collagenase perfusion of the liver. Protective effect of extracts against oxidative injury (*tert*-butylhydroperoxide and allyl alcohol) was tested on hepatocyte primary cultures. The effect on gluconeogenesis from different precursors (lactate/pyruvate, dihydroxyacetone and aspartate) was evaluated in suspensions of rat hepatocytes in comparison with metformin (1,1-dimethylbiguanide). We demonstrated a dose-dependent protective effect on rat hepatocytes in primary cultures in concentrations ranging from 1 to 1000 µg/ml and a significant reduction of gluconeogenesis in the presence of 10 mg/ml of an aqueous extract IV. Ongoing studies to evaluate the effects of extracts on glycogenolysis on rats *in vitro* as well as *in vivo* are in progress.

Table 1: Antioxidant activities

Extract	DPPH	Microsomes	Mitochondria	X/XOD
	IC ₅₀ (µg/ml)			SOD (U/ml)
I	16.1 ± 3.4	23.8 ± 7.8	22.2 ± 9.3	24.8 ± 8.6
II	24.3 ± 2.7	32.8 ± 2.3	27.6 ± 9.9	29.1 ± 10.2
III	31.1 ± 1.4	361.1 ± 24.6	212.8 ± 13.5	30.5 ± 12.4
IV	33.4 ± 0.8	465.3 ± 13.9	404.1 ± 57.9	34.8 ± 10.5

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 303/01/0171), Ministry of Industry and Commerce (grant No. FD-K/096) and Ministry of Education of the Czech Republic (MSM 151100003).

DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA V ANALÝZE PROTEOMU *ARABIDOPSIS THALIANA*: NA POČÁTKU DLOUHÉHO PŘÍBĚHU
TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS IN ANALYSIS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* PROTEOME: A BEGINNING OF A LONG STORY

Pavčina Váňová, Gabriela Böhmová, Hana Konečná, Zbyněk Zdráhal, Břetislav Brzobohatý
Department of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, CZ-61137 Brno, Czech Republic

An experimental set-up to analyse dynamics of proteome changes in response to regulated changes in endogenous levels of plant hormones cytokinins is being established. In long-term, the proteome-based approach is expected to deepen our knowledge of biological functions of cytokinins. As the first step, the classical proteome analysis approach based on

protein separation by 2-D electrophoresis followed by protein digestion and identification by mass spectrometry was optimised for a model plant – *Arabidopsis thaliana*.

We will report results of optimisation of (i) a whole-protein extraction protocol, (ii) conditions for the isoelectric focusing (IEF; the first dimension), and (iii) conditions for the sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; the second dimension). Successful 2-D electrophoretic separation of proteins of *Arabidopsis thaliana* protein extracts allowed us to select several protein spots for identification by mass spectroscopy of the corresponding proteins. The proteins in the selected spots were in-gel digested with trypsin and resulting peptides were subjected to MALDI-TOF MS analysis. Identified proteins (e.g. myosinase precursor) will serve as valuable reference markers (pI, MW) for subsequent characterisation of yet unknown proteins.

This work was supported by grants MSM143100008 and FRVŠ 796/2003 from the Ministry of Education of the Czech Republic.

MULTIENZYME ELECTROCHEMICAL ARRAY SENSOR FOR DETERMINATION OF PHENOLS AND PESTICIDES

Renáta Solná¹, Svetlana Sapelnikova², Petr Skládal¹, Jenny Emnéus², Tautgirdas Ruzgas²
¹ Department of Biochemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
² Department of Analytical Chemistry, Lund University, P.O. Box 124, 221 00 Lund, Sweden

Determination of phenols and pesticides (organophosphates and carbamates) poses a high environmental importance; some of them exhibit fairly high toxicity. Bioanalytical assays including biochemical sensors appear as a reliable alternative to the classical instrumental methods for these toxic compounds; the potential advantages include relatively low cost of operation, the potential of miniaturisation and the rapid and simple detection providing the possibility of fast screening purposes.

The screen-printed four-electrode array system was developed for determination of phenols and pesticides using immobilised tyrosinase, peroxidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Acetylthiocholine chloride was chosen as substrate for cholinesterases to measure inhibition by pesticides, hydrogen peroxide served as co-substrate for peroxidase to measure phenols. The compatibility of hydrolases and oxidoreductases working in the same array was studied. The detection of p-cresol, catechol and phenol as well as of pesticides including carbaryl, heptenophos and fenitrothion was performed in flow-through and steady state arrangements. In addition, the effects of heavy metals (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+}), fluoride (NaF), benzene and dimethylsulphoxide on cholinesterase activities were evaluated.

The achieved relative standard deviations values obtained for the flow system were below 5 % for the same sensor and less than 15 % within a group of 5 sensors; for the steady-state system, RSDs were approximately twice higher. One assay was completed in less than 5 min. The limit of detection for catechol using tyrosinase was equal to 0.35 and 1.7 μM in the flow and steady-state systems, respectively. On the contrary, lower limits of detection for pesticides were achieved in the steady state system - carbaryl 22 nM (4.5 $\mu\text{g/l}$), heptenophos 0.72 nM (0.18 $\mu\text{g/l}$) and fenitrothion 13 nM (3.8 $\mu\text{g/l}$). The compatibility of the above mentioned enzyme array enables to apply the developed multichannel biosensors for evaluation in real samples.

This work has financially supported by the European Commission (project INTELLISENS, contract number: QLK3-2000-01481).

Postery

IN VITRO CLONING AND EXPRESSION OF *ACTINOBACILLUS*
PLEUROPNEUMONIAE GENE FOR APX II PROTEIN
IN VITRO KLONOVÁNÍ A EXPRESE GENU PRO APX II PROTEIN BAKTERIE
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Burdychová R¹., Rychtera M¹., Bartoš M².

¹Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno

²Genex CZ, s. r. o., Podstránská 74, 627 00 Brno

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. 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 (1). 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 (2) 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 (3).

In this study, the recombinant *Actinobacillus 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.

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. The Apx II production reached a level of 4,5 mg/litre over an expression period of 3h.

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

- [1] Jacobsen MJ, Nielsen JP, Nielsen R. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet. Microbiol.* 1996;49(34):159-68.
- [2] Devenish J., Rosendal S., Bosse JT. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 1990;58(12):3829-32.
- [3] Van den Bosh JF., et al. Heterologous protection induced by an *A. pleuropneumoniae* subunit vaccine. *Proc. Int. Pig Vet. Soc.* 1990:11:11.

AGE PRODUCTS FORMATION AS A RESULT OF IN VITRO GLYCATION OF
AMINOTRANSFERASES
TVORBA AGE PRODUKTŮ JAKO DŮSLEDEK GLYKACE AMINOTRANSFERAS
V PODMÍNKÁCH IN VITRO

Beránek Martin, Dršata Jaroslav¹, Palička Vladimír

*Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty Hospital, 50005 Hradec Kralove
and ¹Charles University Faculty of Pharmacy and the Research Centre LN00B125, Hradec
Kralove; beranek@lfhk.cuni.cz*

It is known that aminotransferases incubated in the presence of high concentrations of monosaccharides lost their catalytic activities according to the type of sugar present in the incubation mixture, the reaction temperature and the duration of such experiment. The object of this study is to find whether advanced glycation product (AGE) formation is associated to a long-term aminotransferase glycation reaction (up to 51 days) performed in vitro under various experimental conditions.

Commercially available purified alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1) (Sigma, St. Louis, MO, USA) were incubated in the presence of D-fructose at final concentrations of 50 mmol/l and 500 mmol/l for 51 days. Reaction temperatures were 4 °C, 25 °C or 37 °C. Changes in catalytic activities of both enzymes were measured on a Hitachi 917 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) during the whole incubation period. After 51 days a spectrofluorometric analysis was carried out on a LS-50B fluorescence spectrometer (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Excitation at 370 nm and emission at 440 nm characterising AGEs formation were selected. As a control sample the appropriate enzyme in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) was used.

Emission fluorescence spectra found a higher fluorescent signal at 440 nm in the 500 mM D-fructose ALT samples at all reaction temperatures (114.3 fluorescence units per mg protein {fU/mg} at 4 °C; 159.0 fU/mg at 25 °C; 280.5 fU/mg at 37 °C) than in the ALT samples containing 50 mM D-fructose (37.5 fU/mg; 42.9 fU/mg; 65.4 fU/mg) and in the ALT control sample (7.5 fU/mg; 12 fU/mg; 8.4 fU/mg). Residual catalytic activities of ALT on experimental day 10, expressed in ratio to the control sample, were: i) 67% at 4 °C; 0% at 25 °C; 0% at 37 °C in the 500 mM D-fructose samples, and ii) 99%; 24%; 0% in the 50 mM D-fructose samples. Measurement on day 51 did not find any ALT activity in all the ALT samples containing D-fructose.

The AST samples with 500 mM D-fructose also showed a higher fluorescence at 440 nm (85.8 fU/mg at 4 °C; 111.6 fU/mg at 25 °C; 144.4 fU/mg at 37 °C) than the 50 mM D-fructose AST samples (23.8 fU/mg; 28.8 fU/mg; 33.8 fU/mg) and the AST control (5.6 fU/mg; 6.4 fU/mg; 6.2 fU/mg). Relative residual catalytic activities of AST on day 10 were: i) 97% at 4 °C; 31% at 25 °C; 5% at 37 °C in the 500 mM samples, and ii) 104%; 90%; 36% in the 50 mM samples. On day 51 the residual activities were 60%; 0%; 0% in the 500 mM samples and 100%; 33% and 0% in the 50 mM samples.

Our results demonstrate that aminotransferases incubated in a medium containing D-fructose are subject to varying degrees of their modification caused glycation that are followed by a consequent creation of AGE products. Our findings could contribute to a possibility of in vitro modelling antioxidative effects of new pharmacologically active substances in the future.

The study was supported by the research project MSM 111600002 of the Czech Ministry of Education.

THE EXPLANATION OF THE INHIBITION EFFECT OF ELLIPTICINE ON CYTOCHROMES P450

Marie Stiborová¹, Dagmar Aimová¹, Tereza Dlouhá¹ and Eva Frei²

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, The Czech Republic*

²*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Reserach Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany*

Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) and several of its derivatives isolated from *Apocyanaceae* plants (i.e. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*) are alkaloids exhibiting significant antineoplastic and anti-HIV activities. Cytochromes P450 (CYP) are believed to be the major enzymes catalyzing the metabolism of ellipticine. We described that CYP-dependent metabolism of ellipticine leads to activation of this agent to more efficient metabolite(s) forming DNA adducts [1,2]. This implicates the potential importance of several CYPs in producing these more active antitumor metabolite(s). Ellipticine was also found to be an inhibitor of cytochromes P450, frequently used as a “selective” inhibitor of one of the cytochrome P450, CYP1A1. Although ellipticine was reported to be a selective and strong inhibitor of CYP1A1, we found that its inhibitory potential is non-specific.

Ellipticine binds with affinity greater than most other compounds known to interact with CYPs. Ellipticine interacts with CYPs of microsomes isolated from livers of uninduced rats and those of rats pre-treated with β -naphthoflavone (β -NF) (enriched with CYP1A1/2), pregnenolon 16 α -carbonitril (PCN) (enriched with CYP3A1/2), phenobarbital (PB) (enriched with CYP2B1/2) and ethanol (enriched with CYP2E1) exhibiting a reverse type I binding spectrum (λ_{\max} 430 nm). The apparent dissociation constant (K_s) values, reflecting the affinity of ellipticine to microsomal CYPs, were 1.44, 2.38, 5.71, 16.63 and 2.26 μ M, respectively.

Control, β -NF-, PB-, ethanol- and PCN-induced microsomal CYP activities are inhibited by ellipticine. A degree of CYP inhibition by the compound was quantified. Ellipticine is the most potent inhibitor for CYP3A-dependent 6 β -hydroxylation of progesterone ($K_i=0.021$ μ M), followed by CYP1A1/2-dependent EROD activity ($K_i=0.038$ μ M) and CYP2B-mediated PROD activity ($K_i=0.05$ μ M). Ellipticine acts as a non-competitive or mixed-type inhibitor of these enzymes. Lower, but measurable, inhibition was detected for 1' hydroxylation of bufurazol, 21-hydroxylation of progesterone and 6-hydroxylation of chlorzoxazone catalyzed by CYP2D, CYP2C and CYP2E1, respectively.

The results indicate that degrees of inhibition by ellipticine might be explained by its differential potency to bind to individual CYP or its inhibition of another enzyme of the microsomal system, NADPH:CYP reductase. The exact mechanism responsible for CYP inhibition by ellipticine is discussed.

References

- 1) Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1675-1684 (2001).
- 2) Frei E., Bieler C.A., Arlt V., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.*, 64, 289-295 (2002)..

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

AMYLIN – MOŽNÉ VYUŽITÍ V LÉČBĚ OSTEOPORÓZY AMYLIN – A POSSIBLE IMPLICATION IN THE TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

Bronský, J.¹, Pechová, M.¹, Zadina, J.¹, Čepová, J.¹, Bartášková, D.² a Průša, R.¹

¹ Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol, V Úvalu 84,
150 06, Praha 5

² I. interní klinika UK 2.LF a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06, Praha 5

Amylin je polypeptidový hormon produkovaný v pankreatických beta-buňkách, který náleží do skupiny calcitonin gene-related peptidů. Mezi amylinem a calcitoninem je 20% sekvenční homologie a mezi amylinem a calcitonin gene-related peptidem 44%. V experimentu na hlodavcích amylin a jeho fragment při dlouhodobé aplikaci stimulují proliferaci osteoblastů, inhibují kostní resorpci a zvyšují kostní densitu a množství kostní tkáně.

V našem experimentu jsme měřili plazmatické hladiny celkového amylinu a jeho fragmentu (1 – 20) u pacientů s osteoporózou (n = 28; 3 muži, 25 žen; průměrný věk 65 let), diabetem mellitem II. typu (n = 10; 5 mužů, 5 žen; 64 let) a v kontrolní skupině (n = 24; 11 mužů, 13 žen; 53 let) s použitím ELISA kitu s imunofluorescenční detekcí (*Linco*).

Plazmatické hladiny celkového amylinu u pacientů s osteoporózou se pohybovaly v rozmezí $3,329 \pm 0,462$ pmol/l (mean \pm SEM), u pacientů s diabetem II. typu $6,292 \pm 1,465$ pmol/l a u kontrolní skupiny $8,479 \pm 3,122$ pmol/l. Plazmatické hladiny byly signifikantně nižší u pacientů s osteoporózou než u pacientů s diabetem ($p < 0,05$). Plazmatické hladiny amylinového fragmentu (1 – 20) u pacientů s osteoporózou (n = 28) byly $2,509 \pm 0,869$ pmol/l, u pacientů s diabetem II. typu (n = 12) $4,147 \pm 0,946$ pmol/l a v kontrolní skupině (n = 5) $13,5 \pm 3,935$ pmol/l. Plazmatické hladiny byly signifikantně nižší u pacientů s osteoporózou než u pacientů s diabetem ($p < 0,01$) a než u kontrolní skupiny ($p < 0,001$).

U pacientů s osteoporózou jsme našli snížené plazmatické hladiny amylinu. Deficit amylinu u těchto pacientů může přispívat k rozvoji osteoporotických změn. Amylin by měl proto být zkoumán v souvislosti s farmakoterapií osteoporózy.

Práce byla podpořena Institutem DANONE a výzkumným záměrem VZ MŠMT 111300003.

ANALÝZA POLYMORFISMU DNA MARKERŮ U PŘÍRODNÍCH POZDNĚ KVETOUČÍCH LINIÍ *ARABIDOPSIS THALIANA* THE ANALYSIS OF DNA POLYMORPHISM IN NATURAL LATE FLOWERING GENOTYPES OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Martina Dadejová, Pavel Lízal, Jiřina Relichová
*Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární
biologie, Kotlářská 2, 611 37, Brno, Česká republika*

Cílem této práce bylo určit polymorfismus u vybraných DNA markerů mezi pěti přírodními pozdně kvetoucími liniemi z jižní Moravy (*Je-4*, *Je-18*, *Je-27*, *Je-28* a *Hod*) a devíti laboratorními liniemi (*Col*, *Ler*, *S96*, *Di-G*, *H55*, *En-2*, *La-O*, *Nd-O* a *Ws*) *Arabidopsis thaliana*. Výsledky budou využity pro křížení vhodných linií za účelem mapování genů způsobujících pozdnost v přírodních populacích.

Určení mapové pozice genu spočívá ve stanovení četnosti rekombinace sledovaného znaku s markerem. V naší laboratoři k těmto účelům využíváme tzv. DNA markerů založených na PCR, především SSLP (simple sequence length polymorphisms) markery. Jedná se o repetitivní sekvence, jejichž počet opakování se liší u různých genotypů. Při vazbové analýze je vždy křížena rostlina s mapovaným znakem s rostlinou standardního genotypu, přičemž oba genotypy musí být v SSLP markeru vzájemně polymorfni.

Polymorfismus byl sledován u třinácti mikrosatelitních markerů, které rovnoměrně pokrývají celý genom *A. thaliana* - nga 280, ATPASE, nga 1145, nga 168, nga 162, GAPAb, nga6, nga 1111, nga 1139, nga 1107, nga 225, nga 139 a SO191. U všech linií byla pro jednotlivé markery provedena PCR a produkty byly zviditelněny pomocí agarózové elektroforézy. Délka mikrosatelitních sekvencí u jednotlivých linií byla určena programem ANAGEL 1.2.

Na základě zjištěného polymorfismu pozdních genotypů a laboratorních linií bylo navrženo pro všech pět pozdních genotypů křížení se standardem *Col* a *Ler*. Dále byla pro všechny pozdně kvetoucí genotypy (s výjimkou *Je-4*) navržena ještě další dvě křížení tak, aby byl při mapování pokryt celý genom.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM CEZ:J07/98:143100008.

IDENTIFIKACE GENU PRO ENDOLYZIN POLYVALENTNÍHO
STAFYLOKOKOVÉHO BAKTERIOFÁGA 812
IDENTIFICATION OF GENE CODING FOR ENDOLYSIN OF POLYVALENT
STAPHYLOCOCCAL PHAGE 812

Petr Kašpárek¹, Roman Pantůček¹, Martin J. Loessner², Markus Zimmer², Jiří Doškař¹
¹*Katedra genetiky a molekulární biologie PřF MU v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno*
²*Institut für Mikrobiologie, FML Weihenstephan, Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 1, D- 85354 Freising – Weihenstephan, Germany*

Fág 812 je virulentní polyvalentní stafylokokový bakteriofág. Ve směsi se svými mutantami je schopen lyzovat až 95% kmenů *S.aureus* subsp. *aureus* a 43 % kmenů různých druhů koaguláza negativních i pozitivních stafylokoků. Význam fágů se širokým rozmezím hostitele spočívá například v jejich využití ve fágové terapii. Naše studie je zaměřena na identifikaci a bližší charakterizaci genomových sekvencí a genů, které mají vztah k širokému rozmezí hostitele těchto fágů. Mezi ně patří zejména geny, jejichž produkty se vyznačují lytickými vlastnostmi. Byly klonovány a sekvenovány putativní geny pro endolysin (492 aa) a holin (167 aa), které umožňují uvolnění virionů fága 812 z hostitelské buňky. Oba geny vykazují vysoký stupeň homologie s příslušnými geny jiných bakteriofágů. Gen pro endolysin je přerušen intronem kódujícím putativní endonukleázu. Metodou RT-PCR byla v infikovaných stafylokokových buňkách prokázána přítomnost mRNA pro endolysin s vystříženým intronem. Intron v genu pro endolysin teoreticky umožňuje expresi samostatné N-terminální domény, což může přispívat k širokému rozmezí hostitele fága 812.

Práce byla podporována grantem MŠM ČR 1431000008.

ČÁSTEČNÁ CHARAKTERIZACE MAJORITNÍ ALKALICKÉ FORMY
EXTRACELULÁRNÍ POLYGALAKTURONASY PRODUKOVANÉ *AUREOBASIDIUM*
PULLULANS

THE PARTIAL CHARACTERIZATION OF MAJORITY BASIC FORM OF
EXTRACELLULAR POLYGALACTURONASE PRODUCED BY *AUREOBASIDIUM*
PULLULANS

Jiřina Omelková*, Mária Dzúrová, and Eva Stratilová

*Faculty of Chemistry of Technical University of Brno, Purkyňova 118, CZ – 612 00 Brno,
Czech Republic

Institute of Chemistry of Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK – 842 38
Bratislava, Slovakia

Polygalacturonase with isoelectric point about 9.5 produced in first phases of growth of some strains of *Aureobasidium pullulans* was obtained as single active band on thin-layer isoelectrofocusing gel utilizing controlled cultivation of strain CCY 27-1-111. The cultivation was followed by the precipitation of pectin cultivation medium with ammonium sulphate and ethanol, desalting on Sephadex-G25 Medium, and the purification of enzyme form with ion-exchange and gel-permeation chromatography.

The pH optimum of characterized polygalacturonase was 4,6, Mr evaluated by gel permeation chromatography was about 33 000 and the optimum of temperature 48°C. It was stable until 40°C, at higher temperatures its activity rapidly decreased. Pectate as polymeric substrate as well as oligogalacturonides were used for the evaluation of type of the enzyme. Its affinity towards polymeric substrate was very high ($K_m = 7,92 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $V_{\max} = 0,529 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). The evaluation of the action pattern on pectate showed highly random degradation of glycosidic bonds. This is typical for endoenzymes (EC 3.2.1.15), because 50% of decrease of viscosity corresponded to about 2% of degraded glycosidic bonds of the substrate. The action pattern on oligomeric substrates seemed to be similar to that of polygalacturonases produced by fungi. Active site of enzyme consists of four binding sites with active site situated between first and second binding site. Nevertheless, this fact should be confirmed utilizing modified oligogalacturonides.

Acknowledgement. This work was supported by the VEGA grant No. 2/7142/20.

STUDY OF ELLIPTICINE POTENTIAL TO INDUCE CYTOCHROMES P450

Marie Stiborová¹, Tereza Dlouhá¹, Dagmar Aimová¹, Václav Martínek¹, Martina Rupertová¹
and Eva Frei²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40
Prague 2, The Czech Republic

²Department of Molecular Toxicology, German Cancer Reserach Center, Im Neuenheimer
Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany

Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) and several of its derivatives isolated from *Apocyanaceae* plants (i.e. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*) are alkaloids exhibiting significant antineoplastic and anti-HIV activities. Cytochromes P450 (CYP) are believed to be the major enzymes catalyzing the metabolism of ellipticine. We described that

CYP-dependent metabolism of ellipticine leads to activation of this agent to more efficient metabolite(s) forming DNA adducts [1,2]. This implicates the potential importance of several CYPs in producing these more active antitumor metabolite(s). The aim of the present work is to study whether ellipticine could influence the expression of the major enzymes oxidizing this drug, cytochromes P450.

In order to investigate the induction potential of ellipticine for cytochromes P450, Wistar male and female rats were treated with 4, 40, 80 and 120 mg ellipticine per kg of body weight. Because ellipticine was found to bind to aryl hydrocarbon (Ah) receptor, which is known to be responsible for induction of several enzymes including CYP1A1/2, we examined the expression levels of these CYPs in rat livers. Furthermore, the effect of ellipticine on expression of CYP2B1/2, 3A1/2 and 2E1 enzymes were also investigated. Selective antibodies against rat CYP1A1, rabbit CYP2B4 and 2E1, and human CYP3A4 were utilized in this study. An expression of proteins of CYP1A1/2 in rat livers of both sexes is strongly induced by treating of animals with ellipticine. The expression levels of these enzymes in treated rats are one order of magnitude higher than those in control animals. Analogously, the increase of CYP1A1/2 expression correlates with an increase of ethoxyresorufin O-deethylase activity, a marker for CYP1A1/2, or with that of oxidation of Sudan I, a marker for the CYP1A1 activity. The CYP1A1/2 induction is strongly dependent on concentration of ellipticine applied to experimental animals and on the time of their exposition. The induction of other isoforms of cytochromes P450 (CYP2B, 2E1, 3A) is much lower than that of CYP1A1/2.

The results indicate that a long-term treatment of humans with ellipticine might stimulate its pharmacological efficiency against cancer diseases.

References

- 1) Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1675-1684 (2001).
- 2) Frei E., Bieler C.A., Arlt V., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.*, 64, 289-295 (2002)..

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

ANTIMUTAGENNÍ ÚČINKY ZELENÉHO ČAJE

¹Hladíková R., ¹Mikulcová A., ¹Ptáček P., ¹Márová I., ²Němec M.

¹*Chemická fakulta VUT Brno, Purkyňova 118, 612 00 Brno*

²*Přírodovědecká fakulta MU Brno, Tvrdého 14, 602 00 Brno*

Cílem práce je studium antimutagenních a antioxidačních vlastností vodného extraktu zeleného čaje. Zelený čaj představuje bohatý zdroj látek s antioxidačním a potenciálně antimutagenním charakterem. Kvantitativní analýza těchto látek v testovaných extraktech byla provedena pomocí metody RP-HPLC. Pro studium biologických účinků extraktů zeleného čaje byly použity čtyři nezávislé testy genotoxicity: 1.) Amesův test na kmeni *Salmonella typhimurium* TA98, 2.) Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů, 3.) test na kvasinkách *Sacharomyces cerevisiae* D7 a 4.) test na jednobuněčném organismu *Euglena gracilis*. Animutagenita extraktů byla hodnocena jako jejich schopnost inhibovat

mutagenní účinkz referenčních mutagenů. Antioxidační kapacita extraktů byla analyzována kitem „Total antioxidant status“ firmy Randox.

Zelený čaj nevykazoval žádný toxický efekt pro použité organismy (buňky). Ve všech použitých biologických testech byla prokázána vysoká antimutagenní aktivita zeleného čaje. Kromě toho byl potvrzen antimutagenní potenciál standardních čajových katechinů [(–)katechin a (–)katechin-gallát]. U všech testovaných látek byla také potvrzena vysoká antioxidační kapacita.

DIAGNOSTIC OF INVASIVE MENINGOCOCCAL DISEASE BY PCR METHOD AND DYNAMICS OF PCR DETECTION OF MENINGOCOCCAL DNA (DIAGNOSTIKA INVAZIVNÍHO MENINGOKOKOVÉHO ONEMOCNĚNÍ METODOU PCR A DYNAMIKA PCR DETEKCE MENINGOKOKOVÉ DNA)

E. Jindřichová^{1,2}, V. Marešová², P. Křížová¹, J. Kalmusová¹, O. Džupová²

¹ National Reference Laboratory for Meningococcal Infections, National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 42, Prague 10

² 1st Clinic of Infectious Diseases, University Hospital Bulovka, Budínova 2, 180 81, Prague 8

The invasive meningococcal disease still belongs to serious life threatening diseases with high lethality. The PCR method is widely used for the detection of the *Neisseria meningitidis* (*N.m.*), but the dynamics of PCR positivity was not studied yet. We describe first results of our project, which is focused on the determination of time-period after the onset of antibiotic therapy (a.o.ATB) when the DNA of *N.m.* is still detectable in various clinical materials.. The dynamics of PCR was evaluated in the relationship to the clinical course of the illness and compared to classical diagnostic methods. The evaluation of PCR positivity in cerebrospinal fluid (CSF) and blood a.o.ATB is useful for assessment of correct and reliable diagnostic schemes during serious infections by invasive pathogens. Conventionally used methods are highly influenced by the introduced antibiotic therapy and obtained results are usually negative already after several hours.

We assessed the dynamics of the PCR in 18 patients hospitalized at the clinic of infectious diseases with laboratory confirmed invasive meningococcal disease (sepsis and / or meningitis). The CSF was collected in the day of admission and control CSF samples during the hospitalization according to health status. Blood samples were collected from the 1st to the 7th day of hospitalization. The DNA was isolated by Qiagen kit and nested PCR method was used. PCR products were detected on the 2% gel electrophoresis. We performed the PCR in 28 CSF and 63 serum samples.

CSF: In the day of admission, 17 of 18 CSF samples were positive, 5 of them after the onset of antibiotic therapy (2 of them 1 day a.o.ATB., 2 of them 2 days a.o.ATB, 1 of them 3 days a.o.ATB) In 13 patients control lumbar puncture was performed, 5 with positive (2 of them 3 days a.o.ATB, 1 of them 6, 7, days a.o.ATB) and 8 with negative result (2 of them 5 days a.o.ATB, 3 of them 6 days a.o.ATB, 1 of them 8, 12, 13 days a.o.ATB).

Serum: In the day of admission, 7 of 13 serum samples were positive, 3 of them a.o.ATB (2 day a.o. ATB). In samples collected 3 or more days a.o.ATB the DNA of the *N.m.* was not detected.

Till the 3rd day a.o.ATB the majority of samples are positive. The longest period, when we confirmed etiologic agents was 7 day a.o.ATB. The evidence of presence of the pathogen and the identification of the serogroup serves as an important resource for epidemiological analysis and may result in valuable nation-wide surveillance.

IDENTIFIKACE MEZIDRUHOVÝCH BARIÉR KŘÍŽITELNOSTI RODU *TRIFOLIUM* IDENTIFICATION OF INTERSPECIFIC BARRIERS IN *TRIFOLIUM*

Barbara Jungmannová, Jana Řepková,
*Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární
biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno.*

U rodu *Trifolium* se v přirozených podmínkách setkáváme se spontánním vznikem mezidruhovými hybridů jen velmi vzácně. Získání hybridů tohoto typu je ale důležité z hlediska praktického využití ve šlechtění. Mezidruhová hybridizace umožňuje kombinovat geny v rámci různých druhů a tím introdukovat žádoucí vlastnosti do kulturních druhů. *Trifolium pratense* je kulturní druh s nízkou odolností vůči chorobám a chladu. Naproti tomu plané druhy jako *T. alpestre*, *T. medium* a *T. sarosiense* jsou druhy značně rezistentní k různým virovým a houbovým chorobám i vůči vymrzání. Díky těmto znakům jsou perspektivní z hlediska využití jejich genofondu. Přítomnost bariér křížitelnosti komplikuje získávání mezidruhovými hybridů. Tyto bariéry mohou být překonány netradičními metodami in vitro, např. embryokulturami.

Cílem práce je sledování prezygotických a postzygotických bariér inkompatibility po mezidruhovém křížení *T. pratense* s planými druhy *T. alpestre*, *T. medium* a *T. sarosiense*. K prezygotickým bariérám patří neschopnost pylu klíčit na blizně a neschopnost pylové láčky prorůstat čnělkou. Postzygotické bariéry zahrnují poruchy ve vývoji endospermu a embrya. Kulturní druh *T. pratense* byl zastoupen 5 diploidními a 14 tetraploidními genotypy. Jako plané druhy pro reciproká křížení byly využity *T. alpestre*, *T. medium* a *T. sarosiense*. Pro hodnocení prezygotických bariér byla využita metoda barvení kalózy v pylových láčkách anilínovou modří. Prezygotické bariéry byly prokázány po kříženích, ve kterých byly diploidní genotypy *T. pratense* použity jako mateřské s planými druhy *T. alpestre* a *T. medium*. V recipročných kříženích, ve kterých byly jako mateřské použity plané druhy, byly prezygotické bariéry pozorovány u *T. medium* a *T. sarosiense*. U tetraploidních genotypů *T. pratense* byly sledovány prezygotické bariéry jen v několika případech, kdy jako mateřská rostlina byla *T. sarosiense*.

Pro sledování postzygotických bariér byla vypracována a optimalizována metoda projasňování rostlinných pletiv s využitím chloralhydrátu. Jako alternativa bylo dále optimalizováno projasňování pomocí benzyl benzoátu s dibutyl ftalátem (BBD). K pozorování byl využit mikroskop s Nomarského optikou. Obě metody projasňování umožňují identifikovat vývojovou fázi, ve které dochází k absorpci embrya a tím lokalizovat postzygotickou bariéru. Další práce bude zaměřena na vytipování perspektivních kombinací křížení, která budou vhodná pro exstirpaci hybridních embryí a jejich dopěstování v podmínkách in vitro.

Výsledky uváděné v této publikaci byly získány za finanční podpory projektu MSM 143 100008 uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* POMOCÍ
POLYMERÁZOVÉ ŘETEZOVÉ REAKCE A RESTRIKČNÍ ANALÝZY
AMPLIFIKOVANÉ RIBOZOMÁLNÍ DNA (ARDRA)
IDENTIFICATION OF *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* BY POLYMERASE CHAIN
REACTION AND AMPLIFIED RIBOSOMAL DNA RESTRICTION ANALYSIS

J. Křížová, A. Španová, B. Rittich

*Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra mikrobiologie, Tvrdého 14,
60200 Brno*

Z rozsáhlé skupiny bakterií mléčného kvašení mají jen některé rody, druhy, respektive kmeny vlastnosti probiotik, prospěšných lidskému zdraví. Proto je důležité zvolit vhodnou metodu pro jejich identifikaci.

Metoda ARDRA (restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA) využívá amplifikaci oblasti DNA kódující 16S rRNA. S užitím primerů Pbi F1 a Pbi R2 tak vzniká amplifikační produkt délky 914 bp, specifický pro rod *Bifidobacterium*. Tento rodově specifický ampikon je pak dále podrobován restrikční analýze, tzn. hledání restrikčního místa pro restrikční endonukleázy *Bam* HI, *Sau* 3 AI a *Taq* I. Touto technikou lze odlišit druhy *B. infantis*, *B. longum* a *B. animalis* (Roy a Sirois, 2000).

V této práci byl pro restrikční analýzu použit amplifikační produkt jednak purifikovaný srážením etanolem a dále PCR produkt extrahovaný z agarózového gelu, který byl dále purifikován. Restrikcí rodově specifického fragmentu o velikosti 914 bp byly detekovány tyto restrikční produkty: po štěpení enzymem *Bam* HI fragment o velikosti 450 bp, stejně velký fragment po štěpení restrikční endonukleázou *Sau* 3 AI. Po štěpení enzymem *Taq* I byl detekován restrikční fragment o délce 700 bp.

Dále byla v této práci použita pro identifikaci druhu *Bifidobacterium longum* PCR reakce, využívající druhově specifických primerů Pbi F1 a Lon R4. Vznikl amplifikační fragment o délce 875 bp, specifický pro druh *Bifidobacterium longum*. Reakce byla optimalizována na citlivost detekce 2,8 pg DNA/ 25 µl PCR směsi. Současně byla ověřena specificita reakce.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že metoda ARDRA je vhodná pro odlišení některých druhů bifidobakterií, k odlišení bifidobakterií lze použít také druhově specifické primery.

1) Roy D., Sirois S.(2000). Fems Microbiol. Lett. 191, 17-24.

PHOTOAFFINITY LABELING OF CYTOCHROME P450 2B4

Martin Karabec, Petr Hodek

*Charles University in Prague, Faculty of Nature Science, Department of Biochemistry,
Hlavova 2030, 128 43 Prague 2*

Photoaffinity labeling is a chemical modification technique used to study protein structure and interactions. Highly reactive intermediate which is able to modify amino acid residues of a protein is generated by UV-light irradiation at certain place and exact time. The goal of this technique is the identification of protein active centre or binding sites.

Diamantane like compounds are highly specific substrates of phenobarbital-inducible cytochrome P450 2B4. Their affinity for the active centre is documented by spectral

dissociation constants: adamantane, $K_s=1.3 \times 10^{-6}$ mol/l; diamantane, $K_s=0.5 \times 10^{-6}$ mol/l; triamantane, $K_s=4.3 \times 10^{-6}$ mol/l. Diamantane has the highest affinity for an active centre of cytochrome P450 2B4. Hence, diamantane skeleton was used for the construction of photoaffinity label. Its photolabile derivative, 3-azidiamantane [spiro-(diazirine-3,3'-diamantane)] was synthesized and evaluated. 3-Azidiamantane dissociation constant $K_s=1.9 \times 10^{-6}$ mol/l proves its affinity is comparable to diamantane. It guarantees effective binding to the active centre and labeling.

Two UV-light sources for the label photoactivation were compared, first emitting light of 254nm and second 366nm. Photo activation of 90% of 3-azidiamantane by the 254nm source is accompanied by destroying more than 20% of cytochrome P450 2B4, while by 366nm one less than 10%. Upon photolysis (366nm, half live 1.5 minute) 3-azidiamantane gives highly reactive carbene intermediate. Photolysis of 3-azidiamantane in hexan results in formation of 3-hexyldiamantane (48.3%), demonstrating excellent incorporation of carbene intermediate to unactivated C-H bounds.

When photoaffinity label was photolysed in water, the major products were 3-hydroxydiamantane (82.0%, $K_s=49.2 \times 10^{-6}$ mol/l) and 3-diamantanone (14.3%, $K_s=4.6 \times 10^{-6}$ mol/l); those side products of an active intermediate might interfere with active centre labeling.

The experiment for photoaffinity labeling is conducted in three arrangements: photolysis of cytochrome P450 2B4, cytochrome P450 2B4 with 3-azidiamantane and cytochrome P450 2B4 in the presence both 3-azidiamantane and diamantane, used as a competitor to differentiate specifically bounded label in active center and label bound outside.

Labeled cytochrome P450 2B4 is cleaved by trypsin and peptides are separated on HPLC RP C18. Separated peptides from all three arrangements are analyzed on MALDI TOF and MS-DECA and results are compared to distinguish peptides labeled by diamantane originating from the cytochrome P450 2B4 active centre, from those labeled nonspecifically.

This study was supported by Grant MSM-113100001 from Ministry of Education of the Czech Republic.

IDENTIFIKACE GENŮ *ARABIDOPSIS THALIANA* PROSTŘEDNICTVÍM NOVÝCH T-DNA MUTACÍ IDENTIFICATION OF GENES BY T-DNA MUTAGENESIS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Veronika Krejčí, Zdeňka Kyjovská, Jana Řepková
Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, Brno 602 00

Arabidopsis thaliana je široce využívána v rostlinné biologii jako genetický model, který se využívá při identifikaci genů a jejich izolaci. K dosažení tohoto cíle lze užít např. T-DNA inzerční mutagenезi. Sekvence genů identifikované u *A. thaliana* mohou být využity jako sondy pro izolaci odpovídajících genů i u jiných rostlinných druhů.

T-DNA inzerční mutagenезe je způsob přenosu cizích sekvencí DNA prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Bakterie obsahuje Ti-plazmid nesoucí T-DNA, která se začleňuje do náhodných míst rostlinného genomu. Pokud se T-DNA začlení do kódujících oblastí genu, dojde k narušení jeho funkce a může vzniknout mutace, která se projeví ve změně

morfologie listu, plodu nebo květu, narušením procesu embryogeneze či jiných fyziologických nebo biochemických vlastností.

Transformací *A. thaliana* (genetické pozadí Wassilevskaja) prostřednictvím *A. tumefaciens* byly získány 3 linie nazvané S3. Transformace byla provedena vakuovou infiltrací celých rostlin v suspenzi bakterií plazmidem pBGF nesoucím selektovatelný gen *npt* (neomycin phosphotransferáza), který je zodpovědný za rezistenci ke kanamycinu. Na médiu podle Murashige a Skooga (MS) s přidavkem 60mg/l kanamycinu bylo selektováno 11 primárních transformantů linie S3-1, 14 transformantů linie S3-2 a 12 transformantů linie S3-3. Četnost transformace byla vyhodnocena na 0,4 až 0,6 %.

V T₁ generaci transformantů byly pozorovány některé fenotypové změny, které naznačovaly výskyt dominantních mutací, avšak v následujících generacích mutantní charakter pozorovaných změn nebyl potvrzen u žádné z rostlin. U potomstva těchto transformantů heterozygotních pro inzert (generace T₂) byly sledovány fenotypové odchylky, které byly předpokladem vzniku recesivních mutací. Jednalo se o pozdní kvetení, absenci trichomů, zmnožení přízemních růžic listů či květních primordií či zakrslý vzrůst. Zároveň byl sledován počet začleněných inzertů testováním štěpných poměrů na MS médiu s kanamycinem. U všech linií S3 byla potvrzena přítomnost 1 inzertu. Rostliny s fenotypovou odchylkou byly vysety do generace T₃, kde byla ověřena přítomnost transgenu pomocí metody PCR. Kosegregace sledované mutace s markerem byla zatím potvrzena u 1 rostliny, která vykazovala absenci trichomů.

Nově získaná T-DNA inzerční linie s potvrzenou recesivní mutací bude využita k lokalizaci genu do genetické mapy pomocí DNA markerů popř. pro izolaci příslušného genu pomocí molekulárních metod plazmidové záchrany nebo inverzní PCR.

Výsledky uváděné v této publikaci byly získány za finanční podpory projektu MSM 143100008 uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

VLIV EXOGENNÍCH STRESOVÝCH FAKTORŮ A JEJICH KOMBINACÍ NA PRODUKCI KAROTENOIDŮ KVASINKOU *RHODOTORULA GLUTINIS* INFLUENCE OF EXOGENOUS STRESS FACTORS AND THEIR COMBINATIONS ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY YEAST *RHODOTORULA GLUTINIS*

Kočí R., Koutný O., Márová I.

Faculty of Chemistry, Technical University of Brno, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

Rhodotorula glutinis is strictly aerobic red yeast, which is highly sensitive to exogenous stress. In this work the effect of several exogenous stress factors and their combinations on the production of carotenoids and other metabolites (glycerol, TGA, DNA, proteins) was studied.

Yeast cells were grown aerobically at 28°C. As the stress factors were used H₂O₂ (2 mmol/l; 10 mmol/l), NaCl (2%; 10%) and NiCl₂ (0,6 mmol/l; 3 mmol/l) added into cultivation medium 1) at the beginning of exponential phase only 2) in the late exponential phase only 3) in both phases (pre-incubation of cells).

Cells *R. glutinis* exhibited highest tolerance against stress factors added into production medium (late exponential phase). Production of principal carotenoid, β-carotene, was mostly induced by H₂O₂. Pre-incubation of cells by NaCl, thus led to higher production of β-carotene

and to higher tolerance against consequent oxidative stress. Pre-incubation of culture with small amount one of stress factors led to higher tolerance not only against the same stress factor, but also other types of stresses. It seems, that production of carotenoids could act as one of adaptation mechanisms involved in general stress response.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (VZ J 22/98: 263100020), project „KONTAKT” 96/2002-2003).

RAT CYTOCHROMES P450 ARE SUITABLE MODEL ENZYMES MIMICKING THE METABOLIC ACTIVATION OF ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IN HUMANS

Marie Stiborová¹, Lucie Bořek-Dohalská¹, Kateřina Kukačková¹, Martina Rupertová¹ and Eva Frei²

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, The Czech Republic*

²*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69 120 Heidelberg, Germany*

Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) and several of its derivatives isolated from *Apocyanaceae* plants are alkaloids exhibiting significant antineoplastic and anti-HIV activities. Cytochromes P450 (CYP) are believed to be the major enzymes catalyzing the metabolism of ellipticine. We described that CYP-dependent metabolism of ellipticine leads to activation of this agent to more efficient metabolite(s) forming DNA adducts [1,2]. This implicates the potential importance of several CYPs in producing these more active antitumor metabolite(s). Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and/or inhibition of topoisomerase II. Recently, we found that ellipticine also forms covalent DNA adducts and that the formation of the major adduct is dependent on the activation of ellipticine by cytochrome P450 (P450) [1, 2]. The aim of this study was to resolve which organisms may be employed to mimic the CYP-dependent metabolic activation of ellipticine in humans.

We examined rat, rabbit and human hepatic microsomal samples for their ability to activate ellipticine. The extent of activation was determined by binding of [³H]-labeled ellipticine to DNA and by analyzing DNA adducts by ³²P-postlabeling. We identified deoxyguanosine as the target for CYP-mediated ellipticine binding to DNA using polydeoxyribonucleotides and deoxyguanosine 3'-monophosphate. We demonstrate that cytochrome P450 of human hepatic microsomes activating ellipticine to species binding to DNA is analogous to that of rats, but not of rabbits. Most of the ellipticine activation in rat and human hepatic microsomes is attributed to cytochrome P450 enzymes of the same subfamily, CYP3A1/2 and CYP3A4, respectively, while the orthologous enzyme in rabbit hepatic microsomes, CYP3A6, is much less efficient. The CYP2C enzymes in rabbit microsomes seem to be mainly responsible for ellipticine-DNA adduct formation. With purified enzymes, the major role of human CYP3A4, rat CYP3A1 and rabbit CYP2C3 in ellipticine-DNA adduct formation was confirmed. Similarly, generation of an ellipticine metabolite responsible for the formation of the major ellipticine-DNA adduct is generated by CYP3A4 and CYP3A1 in human and rats, respectively, while by CYP2C3 in rabbits.

The results strongly suggest that rats are more suitable models than rabbits mimicking the metabolic activation of ellipticine in humans. These experimental animals are therefore utilized for studies investigating ellipticine action *in vivo*.

References

- 1) Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1675-1684 (2001).
- 2) Frei E., Bieler C.A., Arlt V., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.*, 64, 289-295 (2002).

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

IDENTIFICATION OF MICROSOMAL ENZYMES ACTIVATING CARCINOGENIC ARISTOLOCHIC ACID IN HUMAN

Marie Stiborová¹, Klára Sopková¹, Tereza Kumstýřová¹, Vladimíra Marková¹, Eva Frei² and Heinz H. Schmeiser²

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic*

²*Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany*

Aristolochic acid (AA), a naturally occurring nephrotoxin and carcinogen, is implicated in a unique type of renal fibrosis, designated Chinese herbs nephropathy (CHN) [1,2]. Understanding which enzymes are involved in AA activation and/or detoxication is important in the assessment of an individual susceptibility to this natural carcinogen. We have identified human recombinant CYP1A1, CYP1A2 as well as NADPH:CYP reductase as activating enzymes capable of activating AA to the same DNA adducts observed in CHN patients [2]. However, human recombinant P450s are sometimes not the ideal models of the catalytic properties of human enzymes. Therefore, in order to identify the true human P450 enzymes activating AA, human hepatic and renal microsomal samples from different donors were used in this study.

All human microsomal preparations activated AAI to form the same DNA adducts found in renal tissues of patients suffering with CHN. 7-(Deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolactam I, 7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolactam I and 7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolactam II were identified as AA-DNA adducts formed by AAI activated with human microsomes. The efficiencies of hepatic microsomes to activate AAI was comparable with that of renal microsomes. Correlations between the CYP (and/or NADPH:CYP reductase) catalytic activities and the levels of AAI-DNA adducts in the same set of human hepatic microsomes were used to examine the role of specific human CYP enzymes in AAI activation. The AAI-DNA adduct formation was highly correlated with ethoxyresorufine O-deethylase (EROD) activity, a marker for CYP1A1/2 ($r=0.98$, $P<0.001$). Other catalytic enzyme activities examined did not exhibit significant correlation with the levels of DNA adducts. To confirm the role of CYP1A1/2 in AAI activation, one human hepatic microsomal sample with high CYP1A1/2 activity was selected and incubations were carried out in the absence and presence of CYP1A1 and 1A2 specific inhibitors, α -NF and furafylline, respectively. The AAI-DNA

adduct formation was strongly inhibited by both inhibitors. The results demonstrate an important role of human CYP1A1/2 in activation of AAI in humans. Interaction of AAI with both CYPs, which was studied using the difference spectroscopy and structural modeling of AAI binding to active center of human CYP1A1 and 1A2, explains the efficiency of both CYP enzymes to reductively activate AAI.

References

- [1] C.A. Bieler, M. Stiborová, M. Wiessler, J.-P. Cosyns, C. van Ypersele de Strihou, H.H. Schmeiser (1997) *Carcinogenesis* 18, 1063-1067.
- [2] M. Stiborová, E. Frei, M. Wiessler, H.H. Schmeiser (2001) *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 1128-1137.

Supported by GACR (grant 303/99/0893) and Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

DETEKCE A LOKALIZACE GENETICKÝCH DETERMINANT FAKTORŮ VIRULENCE U *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH SOND DETECTION AND LOCALIZATION OF VIRULENCE FACTOR DETERMINANTS IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USING MOLECULAR PROBES

Michalová Eva, Růžičková Vladislava, Hradecká Helena

*Katedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity
v Brně*

Alimentární enterotoxikózy, toxické epidermolýzy anebo syndrom toxického šoku jsou onemocnění způsobená toxickými exolátkami, produkovanými patogenními kmeny *S. aureus*. V této práci byly Southernovou hybridizací s digoxigeninem značenými molekulárními sondami, připravenými v PCR, lokalizovány sekvence genů kódujících enterotoxiny B, C₁ a C_{2,3}, exfoliatin A a termostabilní nukleázu (TN) na restričních spektrech *Hind*III a *Eco*RI nebo na makrorestričním spektru *Sma*I. Gen *seb* byl u všech SEB-pozitivních kmenů lokalizován v *Eco*RI spektru ve dvou kopiích na fragmentech 1,5-kb a 3,6-kb nebo 8,6-kb; v *Hind*III spektru pak většinou na fragmentu 6,1-kb, zatímco ve *Sma*I spektru se tento gen vyskytoval na různých fragmentech. Gen *sec*₁ byl lokalizován nejčastěji na *Eco*RI fragmentu 8,5-kb a na *Hind*III fragmentu 5,0-kb. Ve *Sma*I spektru byl *sec*₁ potvrzen na fragmentech ~44-kb, ~23-kb nebo ~74-kb. Gen *eta* byl u ETA-pozitivních kmenů většinou lokalizován na těchto fragmentech: *Sma*I ~200-kb, *Eco*RI 4,9 a 2,5-kb a na *Hind*III 6,2 a 4,2-kb. Gen *sec*_{2,3} byl zjištěn na větším počtu *Eco*RI a *Hind*III fragmentů a ve *Sma*I spektru pak nejčastěji na fragmentech ~44-kb a ~100-kb. Výskyt většího počtu signálů indikuje více kopií sekvencí genů kódujících enterotoxiny B a C. Hybridizací nebyla prokázána přítomnost genů *seb*, *sec*₁ a *sec*_{2,3} na plazmidové DNA. Gen *nuc*, kódující termonukleázu, byl lokalizován na *Sma*I fragmentech ~280-kb až ~370-kb. Hybridizace kolonií umožnila detekovat přítomnost genu *sec*₁ přímo v genomu bakterií vyrostlých v koloniích na živném agarovém médiu. Bylo prokázáno, že hybridizace genomové DNA se specifickou molekulární sondou vhodně doplňuje a upřesňuje molekulární diagnostiku virulentních kmenů *S. aureus*.

NOVÁ METODA IDENTIFIKACE DNA MARKERŮ VYUŽÍVAJÍCÍ GENOMOVÉ
DATABÁZE *ARABIDOPSIS THALIANA*
THE NEW METHOD OF IDENTIFICATION OF DNA MARKERS TAKING
ADVANTAGE OF THE GENOME DATABASE OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Pavel Lízal, Jiřina Relichová

*Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární
biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika*

Cílem práce bylo zavedení metodiky pro přeměnu RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markerů na markery CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), které jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Důvodem pro takové konverze je malá vysycenost genomu *A. thaliana* vhodnými PCR-DNA markery. Naproti tomu RFLP markery jsou v genomu zastoupeny velmi početně a lze proto najít vhodný RFLP marker téměř k jakémukoliv genu. Nevýhodou je však pracnější a časově náročnější metodika oproti DNA markerům založených na PCR. Vzhledem k přítomnosti polymorfismu štěpného místa u RFLP byla provedena konverze na markery CAPS, u kterých se využívá polymorfismu štěpného místa u PCR produktu.

Samotná konverze probíhá v pěti krocích. Prvním krokem je výběr vhodného RFLP markeru na základě mapové pozice a polymorfismu štěpného místa. Následuje vyhledání sekvence a štěpného místa pro zvolený restriční enzym. V obou krocích se vychází z internetové databáze „The Arabidopsis Information Resource“ (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). Třetím krokem je navržení PCR primerů k části sekvence, která obsahuje štěpné místo pomocí programu Primer3. Následující dva kroky konverze zahrnují optimalizaci podmínek PCR a restričního štěpení.

Na základě uvedeného postupu byla úspěšně provedena konverze RFLP markeru MI122, který se nalézá na krátkém rameni čtvrtého chromozomu. Uvedený postup lze doporučit při zavádění nových DNA markerů, které jsou v těsné vazbě s konkrétními geny. Metodu lze aplikovat jak v základním výzkumu při vazbovém mapování genů, tak i ve šlechtění, např. při zavádění markerů v těsné vazbě s geny pro šlechtitelsky významný znak.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu Grantové agentury České republiky č.521/02/P127.

EXCESSIVE BROMIDE INTAKE IN THE RAT MARKEDLY INFLUENCES ITS
METABOLISM OF IODINE

Stanislav Pavelka

*Department of Biochemistry, Masaryk University, 611 37 Brno and Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4*

Considerable amounts of bromide are added to the food-chain due to massive use of bromine-containing fumigants (e.g., methyl bromide) in horticulture and post-harvest treatment of various food commodities. Bromide is also the main degradation product of many other bromine compounds produced on a large scale (e.g., ethylene dibromide). Because of the chemical similarity of bromide ion to iodide, interference of surplus exogenous bromide in iodine metabolism could be anticipated. Indeed, we have recently

demonstrated marked effects of an excessively high bromide intake on various aspects of iodine metabolism in adult male and female rats [1-6], as well as in the young whose mothers drank water with high concentrations of bromide [7-8].

To extend our previous findings and to embrace much broader ranges of bromide and iodine intakes, we arranged the present studies in the following manner. Groups of rats were fed either a standard laboratory diet B (iodine-sufficient) or a research low-iodine diet A (Altromin C1042), and drank either distilled water alone or distilled water containing 1 mg iodide per liter or 10 mg iodide per liter. The animals of each group were further divided into four subgroups. Control animals drank distilled water while the animals of three experimental subgroups drank distilled water with the addition of 50, 500 or 5000 mg bromide per liter. After the 14-day treatment, most of the animals were killed and their thyroid glands collected and lyophilized. Concentrations of total iodine and bromine in the lyophilized samples were determined by the short-term instrumental neutron activation analysis [9]. Each of the remaining animal was injected with ^{131}I -iodide on the 15th experimental day, and the ^{131}I radioactivity retained in the whole body and in the isolated thyroid was measured at appropriate time intervals.

The concentration ratio $[\text{I}]/[\text{Br}]$ in the thyroids proved to be a very sensitive marker of even negligibly increased bromide intake in the rats. However, at the level of the whole organism, no effects of bromide were observed in rats maintained on both types of diet and drinking water with the lowest concentration of bromide (50 ppm). On the contrary, very significant effects of high bromide levels in the organism of experimental animals on their iodine metabolism were observed in rats drinking water with the highest content of bromide (5000 ppm). A reduction of the food intake and consequently of the body weight gain was observed in these animals. An increase in the relative weight of the thyroids and a significant decrease in the 24-h uptake of radioiodide by the thyroids were also found in these rats, especially in those fed the low-iodine diet A. The influence of lower bromide intakes on the above parameters was, however, only marginal.

References

- [1] Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J., Švandová E. (2000a) *Biol. Trace Elem. Res.* 76, 57-66.
- [2] Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J. (2000b) *Biol. Trace Elem. Res.* 76, 67-74.
- [3] Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J. (2000c) In: *Trace Elements in Human: New Perspectives* (Ermidou-Pollet S., Pollet S., eds.). University of Athens, Athens (Greece), pp. 179-187.
- [4] Pavelka S., Babický A., Vobecký M. (2000d) In: *Mengen- und Spurenelemente 2000* (Anke M. et al., eds.). Verlag Harald Schubert, Leipzig, pp. 196-204.
- [5] Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J. (2001a) *Biol. Trace Elem. Res.* 82, 125-132.
- [6] Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J. (2001b) *Biol. Trace Elem. Res.* 82, 133-142.
- [7] Pavelka S., Babický A., Lener J., Vobecký M. (2002) *Food Chem. Toxicol.* 40, 1041-1045.
- [8] Vobecký M., Lener J., Babický A., Pavelka S. (2002) *Br. J. Nutr.*, submitted.
- [9] Vobecký M., Babický A., Pavelka S., Lener J. (2000) *J. Trace Microprobe Tech.* 18, 467-473.

This work was supported by the Grant Agency IGA MH CR (grant No. NJ/6109-3).

ENZYMES OF YEAST *CANDIDA TROPICALIS* PARTICIPATING IN BIODEGRADATION OF PHENOL

Jan Páca Jr.¹, Veronika Suchá¹, Markéta Mikšanová¹, Eliška Komárková², Jan Páca², Marie Stiborová¹

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic, Phone: +420-2-21952333, Fax: +420-2-21952331, e-mail: stiborov@natur.cuni.cz*

²*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic; Phone: +420-2-24353785, Fax.: +420-2-24355051, e-mail: Jan.Paca@vscht.cz*

Phenol and its derivatives are toxic chemicals present in wide variety wastewaters including those from the oil refining, petrochemical, coal coking and coal gasification industries. *Candida tropicalis* can use phenol as the sole carbon and energy source. The first step of the aerobic degradation pathways of phenol in yeast involves its hydroxylation to catechol followed by its oxidation with ring-cleaving enzymes. *o*-Fission gives rise to *cis*, *cis*-muconic acid which is converted by further enzymatic steps *via* β -keto adipate to succinate and acetyl-CoA. *m*-Fission leads to 2-hydroxymuconic semialdehyde and further to formate, acetaldehyde, and pyruvate. These products enter the central metabolism of the cell. Up to now, information on the nature of the phenol-oxidizing enzymes in *C. tropicalis* was scarce.

C. tropicalis cells growing on three different grown media in the absence or presence of phenol were homogenized and cellular compartments, such as microsomes and cytosol, were isolated. Both these cellular fractions were characterized for the presence of enzymes, which might be able to oxidize phenol. While no phenol-hydroxylation activities were detected in microsomes and cytosol of cells grown on glucose as the carbon source, evidence was obtained for such an activity in cellular compartments of *C. tropicalis* grown on media containing phenol. Induction of cytochrome P450 (EC 1.14.15.1) and NADPH:cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4), the major components of a mixed function monooxygenase system, was found to be generated by phenol in *C. tropicalis* microsomes. Likewise, an induction potential of phenol for a soluble flavoprotein monooxygenase, NADPH-dependent cytosolic phenol 2-hydroxylase, (EC 1.14.13.7) was detected. Utilizing originally developed method, HPLC, we found that phenol is oxidized by both types of monooxygenases of *C. tropicalis* to catechol, the reaction product, which is essential for initiation of additional steps of phenol degradation. The results demonstrate the progress in resolving the enzymes responsible for the first step of degradation of phenol by yeast *C. tropicalis*.

Supported by the GACR (grant 104/03/0407) and Ministry of Education of the Czech Republic (MSM 1131 00001).

ZMĚNY METABOLICKÉ AKTIVITY BAKTERIÍ RODU *ERWINIA* V PODMÍNKÁCH
OSMOTICKÉHO A OXIDAČNÍHO STRESU
CHANGES OF METABOLIC ACTIVITY OF *ERWINIA SP.* GROWN UNDER
OXIDATIVE AND OSMOTIC STRESS

Pokorná J., Knoppová M., Drábková M., Kočí R., Márová I.
*Department of Food Chemistry and Biotechnology Faculty of Chemistry, Technical
University of Brno, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

The genus *Erwinia* represents nonphotosynthetic bacteria pathogenic mostly for higher plants. The strains *E. herbicola* and *E. carotovora*, respectively, are of increasing interest as industrial microbes producing pectinolytic, cellulolytic and proteolytic enzymes and antileukaemic asparaginase. Cultures of *Erwinia* are producers of carotenoids, which caused yellow-orange coloured phenotype. The aim of this work was to study influence of exogenous stress factors on metabolic activity and carotenoid production by *E. herbicola* and *E. carotovora*.

Bacteria were grown aerobically (28°C, permanent lighting). Exogenous stress was induced by addition of 3% NaCl (osmotic stress), 5 mM NiCl₂ and/or 5 mM H₂O₂ (oxidative stress). During the experiment cell morphology, amount and composition of carotenoids (HPLC/MS), production of neutral lipids, glycerol and extracellular pectinases and proteases were followed.

Bacteria were more sensitive to osmotic stress, a significant decrease of biomass (2.2x), lipids (2.3x), α - and β -carotene (1.8x), lutein (1.8x) and extracellular enzymes (2-3x) was observed. On the other hand, addition of H₂O₂ led to increased production of lipids (1.4x), enzymes (1.1x), carotenes (1.3x) and lutein (1.6x). Production of glycerol was 1.8x higher under salt stress, but 1.6x lower under oxidative stress when compared with control cultivation. Carotenoids produced by *Erwinia sp.* could play a role in protection of cells from both oxidative stress in nature and reactive oxygen species (superoxide, H₂O₂) produced as a first response by plant-pathogen interaction.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem J 22/98:2631000020 a projektem 96/2002-2003 programu Kontakt.

INTERAKCE AROMATASY S FLAVONOIDY
INTERACTION OF AROMATASE WITH FLAVONOIDS

Dana Provazníková, Petr Hodek
*Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra biochemie, Hlavova 2030,
128 40 Praha2*

Aromatasa patří do velké rodiny cytochromů P450. Cytochromy P450 jsou hemthiolátové enzymy, které se podílejí na metabolismu jak endogenních látek (např. steroidních, mastných kyselin, prostaglandinů) tak i látek exogenních (např. léčiv, karcergenů, potravinových aditiv).

Aromatasa katalyzuje v organismu zcela ojedinělou reakci, syntézu estrogenů z androgenů. Je to tedy enzym ovlivňující hormonální rovnováhu. Vedle této úlohy je aromatasa důležitá také z hlediska karcinogenních procesů. Větší koncentrace tohoto enzymu byly nalezeny v rakovinných tkáních prsu a prostaty. Proč aromatasa souvisí s kancerogenezí,

může být dáno tím, že 1. estrogeny jsou buněčné proliferátory, 2. některé metabolity estrogenů jsou karcinogenní látky, 3. aromatasa interaguje také s exogenními látkami, které jí mohou být přeměněny na mutageny. Pokud by se tedy podařilo aromatasu inhibovat, mohli bychom napomoci prevenci rakoviny prsu a prostaty nebo napomoci tomu, aby se nádor opět nevytvořil. Účinnými inhibitory jsou pro strukturní podobnost se steroidními hormony flavonoidní látky. Flavonoidy se ve větší míře vyskytují např. v sóje, třezalce, heřmánku, grapefruitu či chmelu.

Nejsilnějším inhibitorem aromatasy flavonoidní povahy je *alfa*-naftoflavon ($IC_{50}=0,08 \mu M$ - rekombinantní aromatasa). Efektivnější inhibiční účinky jsme očekávali u jeho námi nově navrženého thioanalogu. Zjistili jsme však, že má naopak účinky stimulační (aktivita vzrostla až o 60%). Naším cílem je proto nyní ozřejmění tohoto unikátního jevu.

Efekt thioanalogu *alfa*-naftoflavonu studujeme na lidské aromatasě. K tomu používáme mikrosomální frakci (mikrosomy jsou artefakty endoplazmatického retikula) získanou z lidské placenty od rodiček ovlivněných pouze epidurální analgesií. Tento materiál jsme zvolili proto, že aromatasa se zde vyskytuje v dostatečném množství a také z etického hlediska. Současně pracujeme také s rekombinantní aromatasou.

Stimulačními účinky thioanalogu se podrobně zabýváme jak s fyziologickými substráty tak i se substráty nefyziologickými. Aktivitu aromatasy sledujeme fluorimetricky – v případě nefyziologických substrátů, jakými jsou 7-ethoxykumarin, dibenzylfluorescein, nebo u fyziologických substrátů (steroidní hormony) pomocí chromatografických metod – TLC, HPLC.

Tento projekt je řešen za podpory prostředků grantů GAČR 523/01/0840 a MŠMT ČR MSM-113100001.

STUDY ON THE EFFECT OF ARISTOLOCHIC ACIDS ON ENZYMES ACTIVATING XENOBIOTICS IN RATS

M. Stiborová¹, H. Rýdlová¹, J. Nortier², Vladimíra Marková¹, E. Frei³ and H. H. Schmeiser³
¹*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2*

²*Department of Nephrology, Hopital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels,*

³*Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69120 Heidelberg*

Carcinogenic aristolochic acid (AA) is a plant extract from *Aristolochia* species, which is associated with the endemic renal fibrosis Chinese herbs nephropathy (CHN) and urothelial cancer in CHN patients [1-3]. This unique type of renal failure, caused by the prolonged intake of Chinese herbs during a slimming regimen, was observed for the first time in Belgium in 1991. Understanding which enzymes are involved in AA metabolism and their influencing with components of weight-reducing pills used in a slimming regimen is important in the assessment of an individual susceptibility to this natural carcinogen. We have identified the soluble enzymes DT-diaphorase and xanthine oxidase [4] and the microsomal CYP1A1, CYP1A2 as well as NADPH:CYP reductase as activating systems [5] capable of activating AA in rats to the same DNA adducts observed in CHN patients. Here, we compare not only the efficiencies of enzymes present in rat renal and hepatic microsomal and cytosolic fractions to activate AA to metabolites forming DNA adducts, but also the effect of AA and components of pills used in a slimming regimen on the levels and activities of enzymes activating xenobiotics including AAI.

Renal and hepatic microsomal and cytosolic fractions of rats generated AA-DNA adduct patterns reproducing those found in renal tissue in CHN patients. 7-(Deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolactam I, 7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolactam I and 7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolactam II were identified as AA-DNA adducts formed by AAI. The comparison of AAI-DNA adduct levels formed by rat microsomes and cytosols reveals that the cytosolic enzymatic system is ~1.6 times more efficient in the activation of this carcinogen than microsomes. However, almost no AA-DNA adducts are generated by renal cytosols of human. Pre-treatment of rats with AAI and a natural mixture of AAI and AAI^{II} leads to increasing the activity of reductase implicated into the metabolism xenobiotics including AA, DT-diaphorase, and this correlates with an increase of the efficiency of cytosols to form AA-DNA adducts. The enzymes of microsomal and cytosolic subcellular fractions metabolizing xenobiotics are also influenced by components of weight-reducing pills containing, besides AA, also other substances. The results suggest an important role of cytosolic and microsomal enzymes and their influencing by compounds using in slimming regimen in development of the CHN disease in rats. Extrapolation of results from experimental animals (rats) to humans is discussed.

References

- [1] C.A. Bieler, M. Stiborová, M. Wiessler, J.-P. Cosyns, C. van Ypersele de Strihou, H.H. Schmeiser. (1997) *Carcinogenesis* 18, 1063-1067.
- [2] J.L. Nortier, M.C. Muniz Martinez, H.H. Schmeiser, V.M. Arlt, C.A. Bieler, M. Petein, M.F. Depierreux, L. De Pauw, D. Abramowicz, P. Vereerstraeten, J.L. Vanherweghem. (2000) *New Engl. J. Med.* 342, 1686-1692.
- [3] V. Arlt, M. Stiborová, H.H. Schmeiser (2002) *Mutagenesis* 17, 265-277 (2002).
- [4] Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H.H. (2002) *Carcinogenesis* 23, 617-625 (2002).
- [5] M. Stiborová, E. Frei, M. Wiessler, H.H. Schmeiser (2001) *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 1128-1137.

ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE IS OXIDIZED BY MYELOPEROXODASE AND LACTOPEROXIDASE

Jitka Poljaková¹, Kristina Forsterová¹, Lucie Bořek-Dohalská¹, Markéta Mikšanová¹, Eva Frei² and Marie Stiborová¹

¹*Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2*

²*Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg*

Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) and its more soluble derivatives (9-hydroxyellipticine, 2*N*-methyl-9-hydroxyellipticinium, 2*N*-methyl-9-chloroellipticinium and 2*N*-methyl-9-methoxyellipticinium) exhibit promising results in the treatment of osteolytic breast cancer metastases, myeloblastic leukemia and in a lesser extent kidney sarcoma and tumors of brain. Target breast tumor cells express several enzymes in higher levels than peritumoral tissues. Some of them are cytochromes P450 (CYP) such as CYP1A1, 1B1 and 3A4 and/or peroxidases such as myeloperoxidase or lactoperoxidase. We described that CYP-dependent metabolism of ellipticine leads to activation of this agent to more efficient metabolite(s) forming DNA adducts [1, 2]. This indicates the potential importance of several CYPs in producing these more active antitumor metabolite(s). Since the participation of peroxidases in metabolism of ellipticine has not been identified yet, the aim of the present

work is to extend our knowledge on this issue. Lactoperoxidase, myeloperoxidase and a model plant peroxidase (horseradish peroxidase) were used in our study.

Ellipticine is oxidized by all these peroxidases *via* a radical mechanism. Utilizing originally developed method, HPLC, we found that peroxidase-mediated oxidation of this anticancer agent leads to formation of one major metabolite. Mass spectrometry (MALDI-TOF, EI) was used to characterize this metabolite. The analyses indicate that ellipticine is primarily oxidized to a one electron reaction product (radical), which produces a dimer found as the major metabolite by HPLC. Its formation is inhibited by radical trapping agents (glutathione, NADH) and by DNA or deoxyguanosine 3'-monophosphate.

We found that during oxidation of ellipticine by peroxidases, two ellipticine-DNA adducts, which were generated by CYP-mediated reaction [1, 2], are also formed. Identities of adducts formed by CYPs and peroxidases were confirmed by co-chromatography on HPLC. The involvement of myeloperoxidase and lactoperoxidase in the metabolic activation of ellipticine in the target tumor tissue is discussed.

References.

- 1) Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1675-1684 (2001).
- 2) Frei E., Bieler C.A., Arlt V., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.*, 64, 289-295 (2002).

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/01/0996) and the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE TRANSKRIPTU CHROMOZOMOVÉ TRANSLOKACE T(15;17) JAKO MARKERU AKUTNÍ PROMYELOCYTICKÉ LEUKEMIE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF CHROMOSOMAL TRANSLOCATION T(15;17) AS AN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIE MARKER

Michal Masařík¹, René Kizek¹, Sabina Ševčíková², Jan Vacek¹, Libuše Trnková³, František Jelen¹, Jan Šmarda²

¹Biofyzikální ústav Akademie věd ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

²Katedra genetiky a molekulární biologie a ³Katedra teoretické a fyzikální chemie, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Akutní myeloidní leukémie se dělí na několik podtypů a jedním z nich je i akutní promyelocytická leukémie (APL) subtyp M3, která je cytogeneticky charakterizována chromozomální translokací t(15;17). Translokovaná místa chromozomu obsahují geny, které kódují receptor alfa pro kyselinu retinovou (RAR α) na chromosomu 17 a transkripční faktor PML na chromosomu 15. Transkripce pak vzniká unikátní chimerický transkript označovaný jako PML/RAR α který byl pozorován u všech případů APL^{1, 2}.

Pro určení APL je zcela běžně využívána řada metod (cytochemické, imunologické a cytologické)^{2, 3}. Všechny metody jsou vhodné pro diagnostiku a typizaci AML, ale jejich nevýhodou je poměrně špatný limit zachytu leukemické buňky (jedna leukemická buňka na sto buněk normálních)³. Pro lepší detekci AML se zdá být výhodné využití molekulární analýzy chromozomálních abnormalit na základě stanovení koncentrace mRNA nebo DNA.

Vhodnou metodou je reverzní polymerázová reakce (RT-PCR), která zvýší citlivost záchytu patologické buňky 1 000 až 10 000 krát⁴.

Vysoce citlivou a selektivní metodou pro detekci unikátního smíšeného transkriptu PML/RAR α je elektrochemie spojená se selektivním vyvázáním mRNA. Na kovalentně vázanou sekvenci (T₂₅) na magnetických kuličkách (DYNABEADS) se selektivně vážou molekuly mRNA z buněčného lyzátu⁵. Pro důkaz přítomnosti unikátního transkriptu byla připravena hybridizační sonda s koncovou sekvencí deseti thyminů. Těchto deset thyminů bylo modifikováno osmiem, neboť je známo, že vhodnou elektrochemickou značkou je komplex osmia, který se přednostně naváže na thymin^{5, 6}. Hybridizační nevyvázaná sonda byla odstraněna vymýváním pomocí pufru a vyvázaná sonda byla z magnetických kuliček uvolněna tepelnou denaturací. Potom vlastní elektrochemická detekce PML/RAR α tedy spočívá ve využití takto modifikované hybridizační sondy. Takovou sondu, která hybridizuje ke komplementárnímu řetězci můžeme snadno a citlivě detekovat pomocí diferenční pulzní rozpouštěcí voltametrie na rtuťové visící kapce⁷.

Literatura

- (1) Barbui, T.; Finazzi, G.; Falanga, A. *Blood* 1998, 91, 3093-3102.
- (2) Coco, F. L.; Diverio, D.; Pandolfi, P. P.; Biondi, A.; Rossi, V.; Avvisati, G.; Rambaldi, A.; Arcese, W.; Petti, M. C.; Meloni, G.; Mandelli, F.; Grignani, F.; Masera, G.; Barbui, T.; Pelicci, G. P. *The Lancet* 1992, 340, 1437-1438.
- (3) Hébert, J.; Cayuela, J.-M.; Daniel, M.-T.; Berger, R.; Sigaux, F. *Blood* 1994, 84, 2291-2296.
- (4) Fialová, M.; Ševčíková, S.; Šmarda, J.; Michálek, J. *Neoplasma* 2002, 49, 33-37.
- (5) Paleček, E.; Billová, S.; Havran, L.; Kizek, R.; Mičulková, A.; Jelen, F. *Talanta* 2002, 56, 919-930.
- (6) Paleček, E.; Kizek, R.; Havran, L.; Billová, S.; Fojta, M. *Anal. Chim. Acta* 2002, 469, 73-83.
- (7) Kizek, R.; Havran, L.; Fojta, M.; Paleček, E. *Bioelectrochemistry* 2002, 55, 119-121.

Práce byla finančně podporována granty 203/02/0422 GA ČR a A 1163201 GA AV ČR.

IDENTIFIKACE VYBRANÝCH DRUHŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POMOCÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE THE IDENTIFICATION OF CERTAIN SPECIES OF LACTIC ACID BACTERIA BY THE PCR

Eva Soudková, Španová, A., Rittich, B.

Katedra mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university, Brno

Detekce a identifikace různých druhů bakterií mléčného kvašení, které se využívají v potravinářském průmyslu, je důležitá při kontrole kvality mléčných produktů, při identifikaci probiotických kmenů a pro sledování fermentačních procesů. Identifikace pomocí klasických kultivačních metod je obtížná, protože morfologie buněk je značně ovlivněna růstovými podmínkami. Oproti tomu, molekulární metody umožňují rychlou a přesnou identifikaci bakterií. Mezi nejběžnější patří metoda polymerázové řetězové reakce (PCR).

PCR byla prováděna s využitím rodově specifických primerů pro rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. K amplifikaci specifického fragmentu byla použita purifikovaná DNA

sbírkových kmenů *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve* a *Lactobacillus acidophilus*. Jako matrice sloužila také celková DNA izolovaná z fermentovaných mléčných výrobků (zákys s probiotickou kulturou, acidofilní mléko, jogurtové nápoje, jogurty). Izolace DNA byla prováděna metodou fenolové extrakce. Koncentrace a čistota DNA byla stanovována spektrofotometricky.

Rod *Bifidobacterium* byl identifikován pomocí primerů Pbi F1 a Pbi R2, které jsou komplementární ke konzervativním sekvencím v oblasti pro 16S rDNA (1). Specifický produkt o délce 914 bp byl detekován agarózovou gelovou elektroforézou.

Identifikace rodu *Lactobacillus* byla provedena pomocí specifického primeru LbLMA1-rev, který se váže na sekvenci nacházející se mezi 16S a 23S rDNA, a univerzálního primeru R16-1, který se váže na terminální oblast genů pro 16S rRNA. PCR produkt má délku přibližně 250 bp (2).

Byla provedena identifikace bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* pomocí rodově specifických primerů u všech sbírkových kmenů a potvrzena přítomnost bifidobakterií i laktobacilů ve zkoumaných potravinách.

Použitá literatura:

(1) D. Roy, S. Sirois, FEMS Microbiology letters, 2000

(2) S. Dubernet, N. Desmases, FEMS Microbiology letters, 2002

CHARACTERIZATION OF ENZYMES METABOLIZING ARISTOLOCHIC ACID IN HUMAN HEPATIC AND RENAL CYTOSOLS

Marie Stiborová¹, Martina Laňková¹, Tereza Kumstýřová¹, Vladimíra Marková¹, Eva Frei² and Heinz H. Schmeiser²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic

²Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany

Aristolochic acid (AA), a naturally occurring nephrotoxin and rodent carcinogen, has recently been associated with the development of urothelial cancer in humans [1, 2]. Understanding which enzymes are involved in AA activation and/or detoxication is important in the assessment of an individual susceptibility to this natural carcinogen. Recently, we examined the ability of enzymes of rat renal and hepatic cytosolic fractions to activate AA to metabolites forming DNA adducts and found that most of the cytosolic activation of AA is mediated by DT-diaphorase, although a role of cytosolic xanthine oxidase (XO) cannot be ruled out [3]. With purified DT-diaphorase, the participation of this enzyme in the formation of AA-DNA adducts was confirmed [3]. However, rat enzymes are sometimes not the ideal models of the catalytic properties of human enzymes. Therefore, in order to identify the human cytosolic enzymes activating AA, human hepatic and renal cytosolic samples from different donors were used in the study.

Enzymes of human hepatic cytosolic fractions generated AAI-DNA adduct patterns reproducing those found in renal tissues from humans exposed to AA. 7-(Deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolactam I, 7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolactam I and 7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolactam II were identified as AA-DNA adducts formed from AAI by human hepatic cytosol. However, almost no AAI-DNA adducts were generated upon incubation of AAI with

cytosol isolated from the human renal tissue. According to the structures of the DNA adducts identified, nitroreduction is the crucial pathway in the metabolic activation of AAI. To define the role of cytosolic reductases in the reductive activation of AAI, we investigated the modulation of AAI-DNA adduct formation by cofactors or selective inhibitors of the cytosolic reductases, DT-diaphorase, XO and aldehyde oxidase. The role of the enzymes in AAI activation was also investigated by correlating the DT-diaphorase- and XO-dependent catalytic activities in cytosolic sample with the levels of AAI-DNA adducts formed by the same cytosolic sample. On the basis of these studies, we attribute most of the cytosolic activation of AAI to human DT-diaphorase. The binding orientation of AAI in the active site of rat and human DT-diaphorase was predicted by computer modeling based on published X-ray structures.

The results presented here are the first report demonstrating a reductive activation of carcinogenic AAI by human DT-diaphorase.

References

- [1] C.A. Bieler, M. Stiborová, M. Wiessler, J.-P. Cosyns, C. van Ypersele de Strihou, H.H. Schmeiser (1997) *Carcinogenesis* 18, 1063-1067.
- [2] Arlt V., Stiborová M., Schmeiser H.H. (2002) *Mutagenesis* 17, 265-277 (2002).
- [3] Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H.H. (2002) *Carcinogenesis* 23, 617-625 (2002).

Supported by GACR (grant 303/99/0893) and Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM 1131 00001).

HIGH BROMIDE INTAKE IN THE RAT DAM AFFECTS TRANSFER OF BOTH IODIDE AND BROMIDE

S. Pavelka^{1,2}, M. Vobecký³, A. Babický³ and A. Lytvynets²

¹*Department of Biochemistry, Masaryk University, 611 37 Brno;* ²*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4 and* ³*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4*

In a preliminary paper [1], we studied an impact of very high bromide intake in lactating rats on iodine transfer to the sucklings through mother's milk. In subsequent papers, we have also shown that high bromide levels in the dams' organism adversely affected the development of their young, as well as their own performance (e.g., production of mother's milk) [2, 3]. In the present studies, we confirmed our previous findings and examined some other consequences of high bromide intake in the rat dams, namely the transfer of excess bromide through mother's milk.

Experiments with lactating dams (each being kept with a nest of eight sucklings) were performed in a similar way as in [1-3]. In the course of the nursing period, from the second to the 17th post-partum day, the mothers drank either distilled water (control dams) or distilled water with the addition of 1 g bromide or 5 g bromide per liter (experimental groups). In addition, some of the dams were injected either with ⁸²Br-bromide or with ¹³¹I-iodide on the 12th day of the lactation period. Subsequently, the amount of ⁸²Br and ¹³¹I radioactivity transferred through mother's milk to the sucklings and the radioactivity retained in the dams was measured in vivo, at appropriate time intervals after radiobromide or radioiodide

application, by using a gamma-spectrometric system equipped with an HPGe detector [4]. After the last measurement of the whole-body radioactivity, the mothers and the young were killed, and their thyroid glands were collected and weighed.

Very high bromide intake in the dams (about 220 mg bromide per day per dam in animals drinking water with the addition of 5 g bromide per liter) caused a marked decrease in the body weight increments in the sucklings. High bromide levels in the mothers also adversely affected the thyroids of the young and in this way impaired their development. In the dams themselves, two striking features undoubtedly caused by high bromide intake were observed. Stagnation in the extent of diet and water consumption in the course of the nursing period, and a drop in the production rate of mother's milk. Analysis of the rat milk proved an easy permeation of bromide and iodide ions. Bromide penetrated into mother's milk was then transferred in a large extent to the sucklings. However, in comparison with the transfer of iodide, the rate of bromide transfer was much slower.

References

- [1] Pavelka S., Babický A., Lener J., Vobecký M. (2002) Food Chem. Toxicol. 40, 1041-1045.
- [2] Pavelka S. (2002) In: Macro and Trace Elements/Mengen- und Spurenelemente (Anke M. et al., eds.). Schubert-Verlag, Leipzig, pp. 575-583.
- [3] Vobecký M., Lener J., Babický A., Pavelka S. (2002) Br. J. Nutr., submitted.
- [4] Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J., Švandová E. (2000) Biol. Trace Elem. Res. 76, 57-66.

This work was supported by the Grant Agency IGA MH CR (grant No. NJ/6109-3).

ROSTLINNÉ METALLOTHIONEINY V EXPLANTÁTOVÝCH KULTURÁCH SMRKU ZTEPILÉHO (PICEA ABIES L.) PLANT METALLOTHIONEINS IN EXPLANTATE CULTURE OF SPRUCE (PICEA ABIES L.)

Jan Vacek^{1,2}, Jiří Petřek², Ladislav Havel², Bořivoj Klejdus³, René Kizek¹

¹Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno 612 65

²Ústav botaniky a fyziologie rostlin, MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno

³Ústav chemie a biochemie, MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Nejrůznější zdroje znečištění přinutily mikroorganismy, rostliny i živočichy k vytvoření ochranných mechanismů. V jejich životním prostředí je přítomna celá škála prvků včetně těžkých kovů, které představují jednu z nejvýznamnějších skupin toxických látek. Mechanismy detoxifikace a metabolismus těžkých kovů jsou intenzivně studovány u různých organismů. Pokud jsou rostliny vystaveny přítomnosti těžkých kovů zahájí rostlinné buňky syntézu fytochelatinů (PC), což jsou peptidy, které mají schopnost vázat těžké kovy a zajišťují tak rostlině transport toxických iontů do těch partií buňky (vakuola) kde již bezprostředně svou toxicitou rostlinný organismus neohrožují. Tyto peptidy jsou také označovány jako rostlinné metallothioneiny. PC mají základní strukturu (γ -Glu-Cys)_n-Gly) kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu (γ -Glu-Cys) může opakovat 2 až 11krát (nejčastěji 2–5krát). PC obsahují velké množství cysteinů (SH skupiny odpovídají za vazbu iontů kovů) a jsou syntetizovány posttranslačně redukcí glutathionu (GSH).

Inokula raných embryí smrku ztepilého (klonu E 2) byly po týdenní kultivaci na agarovém mediu. Homogenizovány v fosfátovém pufru (pH 7). Buněčné membrány byly rozrušeny ultrazvukem a denaturovány při teplotě 99 °C, centrifugovány 30 min, 4 °C, 14 000 rpm. V odebraném homogenátu byla provedena analýza PC. Při analýze byl použit elektrochemický analyzátor AUTOLAB v tříelektrodovém systému zapojení VA-Stand 663 Metrohm s pracovní rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) – povrch kapky 0.4 mm², referentní Ag/AgCl/3 M KCl a pomocnou Pt-elektrodou.

PC byly studovány technikou adsorptivní přenosové diferenční pulsní voltametrie (AdT DPV) adsorpcí na elektrodu z malého množství vzorku. Byla srovnána elektrochemická odezva PC na rtuťové pracovní elektrodě. Na HMDE byly pozorovány katalytické signály PC (pik H a Brdičkova reakce). Koncentrace PC byla detekována adsorptivní přenosovou chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou (AdT CPSA) s detekčním limitem pod 1 ng/mL. Vliv těžkých kovů na růst embrya smrku byl studován metodou analýzy obrazu (kamera SONY CCD)

Vypracované elektrochemické techniky stanovení bude možné uplatnit při stanovení PC přímo v biologickém materiálu.

Literatura

- Vacek J., Kizek R., Klejdus B., Havel L.: Biol. listy, odesláno
TRNKOVÁ L., KIZEK R., VACEK J.: BIOELECTROCHEMISTRY, 56, 2002, 57-61
Kizek R., Trnková L. Paleček E. Anal. Chem. 73, 2001, 4801-4807
FERNÁNDEZ-BOBES C., ET AL.: ELECTROANAL., 10 (1998) 701–706
PENCE N.S. ET AL.: PNAS, 97 (2000) 4956–4960
COHEN C.K. ET AL.: PLANT. PHYSIOL., 116 (1998) 1063–1072
THOMINE S. ET AL.: PNAS, 97 (2000) 4991–4996
BAGHOUR M. ET AL.: J. AGRIC. FOOD. CHEM., 49 (2001) 5356–5363

Za podpory projektu FRVŠ 432100001 a 1203/2003.

PRÍPRAVA UNIVERZÁLNÍ SONDY PRO DETEKCI PROFÁGŮ V KMENECH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PREPARATION OF AN UNIVERSAL PROBE FOR PROPHAGE DETECTION IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS

Lenka Pilousová, Roman Pantůček, Jiří Doškař

Katedra genetiky a molekulární biologie PřF MU v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Většina kmenů patogenního bakteriálního druhu *Staphylococcus aureus* je lyzogenních a obsahuje ve svém genomu jednoho nebo více profágů. Přítomnost profágů vede ke změnám fenotypových znaků hostitelských kmenů (k tzv. lyzogenním konverzím), které se často týkají jejich patogenity a virulence, anebo navozují necitlivost k dalším fágům. Cílem práce bylo identifikovat genomovou sekvenci společnou pro fágové druhy 3A, 53 a 77 reprezentující sérologické skupiny A, B a F mírných bakteriofágů mezinárodní standardní řady druhu *S. aureus* a využít ji k přípravě molekulární sondy pro detekci profágových sekvencí v genomech hostitelských kmenů. Vyhledání společné sekvence bylo provedeno reciprokou hybridizací značených celkových genomových DNA fágů 3A a 77 k restričním spektrům (*HindIII/XbaI*) DNA fágů 3A, 53 a 77. Hybridizující restriční fragmenty byly klonovány a

použity jako sondy k ověření přítomnosti identických sekvencí v genomech všech fágů mezinárodní řady. Z testovaných restričních fragmentů byl vybrán fragment *HindIII/XbaI*-F z fága 3A, který hybridizoval k většině fágových DNA (100% zástupců sérologické skupiny A, 100% sérologické skupiny F a 36% sérologické skupiny B fágů mezinárodní standardní řady). Byla stanovena jeho sekvence a srovnána s dosud známými sekvencemi stafylokokových bakteriofágů a profágů identifikovaných v genomech *S. aureus*. Tato sekvence odpovídá části genu pro integrázu a nekódující oblasti mezi tímto genem a genem pro excizionázu. Připravená sonda je vhodná pro identifikaci všech profágů séroskupin A a F a většiny profágů séroskupiny B v kmenech *S. aureus*. Výsledky práce ukázaly, že genomy bakteriofágů *S. aureus* jednotlivých séroskupin obsahují jen velmi omezený počet vzájemně homologních sekvencí DNA, mezi něž patří zejména geny, které se týkají integrace bakteriofágových genomů do genomu hostitelských kmenů.

Práce byla podporována grantem MŠM ČR 1431000008.

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ GLUTATHION-S-TRANSFERASY JAKO
MARKERU POŠKOZENÍ PROXIMÁLNÍCH TUBULŮ
ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE AS
A MARKER OF PROXIMAL TUBULS DAMAGE

Pavel Vrtílek¹, Kizek René², Jan Vacek², Libuše Trnková³

¹*Střední průmyslová škola chemická, Vranovská 65, 614 00 Brno*

²*Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno*

³*Katedra teoretické a fyzikální chemie, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno*

Poruchy metabolismu a výživy, představující jeden z klíčových problémů současné medicíny, způsobují celou řadu civilizačních onemocnění, mezi něž patří i poškození ledvin. V nedávné době bylo ukázáno, že pro přímou detekci poškození proximálních ledvinových tubulů by mohla být vhodným markerem glutathion-S-transferasa. Glutathion-S-transferasa (EC 2.5.1.18 – GST) patří do velké rodiny enzymů, které katalyzují připojení tripeptidu glutathionu (γ -glutamylcysteinyl-glycin) k endogenním nebo exogenním substrátům. Glutathion připojený k hydrofobním a elektrofilním sloučeninám vytváří adukty s vyšší rozpustností ve vodě, které mohou být enzymaticky degradovány na soli merkapturových kyselin a vylučovány z organismu močí. Z hlediska renálního poškození je třeba ze čtyř tříd GST (α -GST, μ -GST, π -GST a τ -GST) sledovat hladinu α -GST, jejíž vzestup indikuje toto poškození. To znamená, že stanovení koncentrace α -GST v moči je senzitivní metoda pro diagnostiku renálního poškození. Bylo zjištěno, že chromatografické stanovení GST v moči není ovlivněno lékem ani změnou pH, což je pozitivním faktem pro sledování renálních funkcí u chronického ledvinového onemocnění nebo reakce ledvin po jejich transplantaci.

Vedle stanovení koncentrace GST v moči pomocí HPLC byla vyzkoušena elektrochemická metoda - diferenční pulsní voltametrie doplněná technikou adsorptivního přenosu (AdT DPV). Při této technice byla GST adsorbována na různých pracovních elektrodách z malého množství pufovaného roztoku. Registrované elektrochemické GST odezvy byly na různých pracovních elektrodách porovnávány. Bylo zjištěno, že uhlíkové elektrody poskytují velmi dobře reprodukovatelné oxidační signály tryptofanu (Trp) a tyrosinu (Tyr). Na rtuťové elektrodě (HMDE) byly pozorovány dva typy katalytických

signálů GST, jednak pík H a pík odpovídající Brdičkově reakci. Na uhlíkové elektrodě byla studována závislost výšky oxidačních signálů na době akumulace a na koncentraci GST.

Dá se předpokládat, že elektrochemické metody se mohou stát velmi užitečným prostředkem pro přímé stanovení GST v biologickém materiálu.

Literatura

Brázdová M., Kizek R., Havran L., Paleček E.: *Bioelectrochemistry*, 55, 2002, 115-118

Trnková L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry*, 56, 2002, 57-61

Andres G.M. et. al.: *Pharmacol. Toxicol.*, 72, 1993, 321–331

Backman L. et al.: *Kidney Int.*, 33, 1988, 571–577

Práce byla finančně podporována granty 203/02/0422 GA ČR a A 1163201 GA AV ČR.



MECHANISMUS SUPRESE ONKOPROTEINU V-MYB PROTEINEM JUN V BUŇKÁCH BM2: AKTIVACE RECEPTORU PRO KYSELINU RETINOVOU MECHANISM OF V-MYB-SUPPRESSION BY JUN PROTEIN IN BM2 CELLS: ACTIVATION OF RETINOIC ACID RECEPTOR

Sabina Ševčíková, Petr Beneš, Jan Šmarda

Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Buňky BM2 jsou kuřecí monoblasty konstitutivně exprimující onkogen *v-myb* viru ptačí myeloblastózy. Dříve jsme prokázali, že jedním ze způsobů jak snížit vysokou úroveň proliferace těchto leukemických buněk a stimulovat jejich terminální diferenciaci, je zvýšit úroveň exprese genů *jun*. Proto jsme připravili varianty buněčné linie BM2, které inducibilně exprimují gen *v-jun* (BM2vJUN) a *c-jun* (BM2cJUN). Oba geny v buňkách BM2vJUN a BM2cJUN způsobili několik fenotypových změn jako např. snížení úrovně proliferace a v případě BM2cJUN také částečnou diferenciaci. Zajímavým znakem, který jsme zaznamenali u obou derivátů BM2, byla zvýšená citlivost na kyselinu retinovou (RA). Dosud bylo známo, že RA může vyvolat terminální diferenciaci buněk BM2, ale pouze za předpokladu, že je v těchto buňkách zvýšena úroveň exprese jaderných receptorů RAR nebo RXR. Podobný účinek jsme překvapivě zaznamenali také v buňkách BM2 exprimujících *v-jun*. Při zkoumání mechanismu tohoto jevu jsme neprokázali žádný vliv proteinu v-Jun na expresi endogenních genů RAR a/nebo RXR. Testy transkripčně aktivační schopnosti endogenního genu RAR v buňkách BM2 a BM2vJUN jednoznačně prokázaly, že tato funkce proteinu RAR je výrazně posílena za přítomnosti v-Jun. Toto pozorování je překvapivé, protože dosud popsáné údaje svědčí spíše o antagonistickém vztahu transkripčního faktoru AP-1 k jaderným receptorům RAR. Z našich experimentů lze vyvodit závěr, že onkoprotein v-Jun potlačuje funkci onkoproteinu v-Myb v buňkách BM2 tím, že stimuluje aktivitu retinoidového receptoru RAR. Tento poznatek dobře navazuje na naši dřívější práce, ve

kterých jsme dokumentovali schopnost proteinu RAR a RXR suprimovat transformační potenciál onkogenu *v-myb* v buňkách BM2.

Tato práce byla sponzorována grantem MŠMT 143100008 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy a grantem č. 301/01/0040 Grantové agentury České republiky.

ZRÁNÍ MONOBLASTŮ BM2 JE DOPROVÁZENO ZVÝŠENOU EXPRESÍ VIMENTINU VIMENTIN EXPRESSION IS UPREGULATED IN MATURING BM2 MONOBLASTS

Jan Šmarda¹, Eva Zahradníčková¹, Hana Konečná², Zbyněk Zdráhal², Jana Šmardová³

¹Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno

²Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Masarykův onkologický ústav, Laboratoř biologie nádorů II, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Buněčná linie BM2 byla připravena infekcí nezralých kuřecích myeloidních buněk virem ptačí myeloblastózy, který transdukuje onkogen *v-myb*. Vzniklé monoblasty konstitutivně exprimují *v-myb* a jejich terminální diferenciaci je proto zablokována. Obnovení diferenciací dráhy buněk BM2 lze dosáhnout např. působením forbolového esteru TPA, inhibitorem histonových deacetyláz trichostatinem A nebo prostřednictvím aktivovaných jaderných receptorů pro kyselinou retinovou (RA). Typ použitého induktoru také rozhoduje o typu konečné diferenciací dráhy, která může směřovat k jednojaderným makrofágům, velkým makrofágovým polykaryonům nebo osteoklastům. V této práci jsme se zaměřili na charakterizaci diferencujících se buněk BM2 a hledání proteinových markerů využitelných při diferenciací studiích. Prokázali jsme, že působením forbolového esteru TPA se v jaderné frakci zrajících buněk BM2 objevuje dominantní protein o molekulové hmotnosti 55 kDa, který není přítomen v buňkách BM2 exprimujících lidský gen RAR vystavených kombinovanému působení TPA/RA. Tento protein byl po elektroforéze v SDS-polyakrylamidovém gelu podroben redukci, alkylaci a poté proteolýze trypsinem přímo v gelu. Po extrakci z gelu byla molekulová hmotnost vzniklých peptidů určena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Srovnáním získaných dat s údaji v databázích jsme tento protein identifikovali jako cytoskeletární protein vimentin. Experimentálně jsme tento závěr potvrdili vimentin-specifickou protilátkou, která při westernovém blotingu označila protein o stejné molekulové hmotnosti. Protože exprese vimentinu zřetelně stoupá v buňkách BM2 indukovaných k diferenciaci působením TPA a trichostatinu A a zůstává nezměněna u buněk BM2RAR indukovaných kyselinou retinovou, můžeme vyvodit závěr, že vimentin představuje vhodný molekulární marker pro rozlišení diferenciací drah buněk BM2.

Tato práce byla sponzorována grantem MSM 143100008 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy a grantem č. 301/03/1055 Grantové agentury České republiky.

Autorský rejstřík

A

Aimová · 41, 44

B

Babický · 63
Bartášková · 42
Bartoš · 39
Beneš · 67
Beránek · 40
Billová · 8
Blein · 25
Böhmová · 37
Borkovcová · 17
Bořek-Dohalská · 13, 51
Bouchal · 17
Brázda · 6
Brázdová · 6, 9
Bronský · 20, 42
Brzobohatý · 15, 17, 23, 24, 35, 37
Burdychová · 39

Č

Čechová · 4
Čepová · 42

D

Dadejová · 42
Damborský · 30
Dlouhá · 41, 44
Dostálek · 16
Doškař · 43, 65
Drábková · 57
Dršata · 40
Durnová · 4
Dvorak · 21
Dvorakova · 21
Dvořáčková · 34
Dzúrová · 44
Džupová · 46

E

El Khaled · 7, 10
Emnéus · 38
Eneva · 24

F

Faitova · 21
Fajkus · 27, 33, 34
Fojta · 6, 8
Fojtová · 5
Forsterová · 59
Frei · 11, 13, 14, 41, 44, 51, 52, 58, 59, 62

G

Genkov · 35

H

Halámek · 16, 22
Halouzka · 4
Hamanová · 28
Hampl · 21
Havel · 25, 64
Havran · 8
Hejátko · 24
Hepel · 16
Hladíková · 45
Hladilová · 7, 10
Hobza · 21, 25
Hodek · 3, 11, 48, 57
Hollerová · 36
Homola · 16
Horáková · 27
Hradecká · 53
Hrazdilová · 10

I

Imberty · 26

J

Jankovský · 28
Jelen · 60
Jesenská · 30
Jindřichová · 46
Jungmannová · 47

K

Kalmusová · 46
Karabec · 48

Kašná · 19
Kašpárek · 43
Kašparovský · 25
Kejnovsky · 25
Kernchen · 22
Kiran · 23
Kizek · 8, 9, 60, 64, 66
Klejdus · 64
Knoppová · 57
Koblas · 3
Kočí · 50, 57
Komárková · 56
Konečná · 17, 37, 68
Kosinová · 18
Kostlánová · 26
Koudela · 19
Koukalová · 34
Koutný · 50
Kovařík · 5, 34
Krejčí · 33, 49
Křížová · 46, 48
Kubičárová · 33
Kučera · 17
Kuchař · 27, 33
Kukačková · 51
Kumstýřová · 52, 62
Kunická · 33
Kyjovská · 49

L

Laňková · 62
Ledvina · 19
Leitch · 34
Lengerova · 25
Lengerová · 21
Lízal · 42, 54
Loessner · 43
Lochman · 28
Lytvynets · 63

M

Makower · 22
Malbeck · 35
Málbeck · 23
Marešová · 46
Marková · 52, 58, 62
Márová · 45, 50, 57
Martínek · 3, 11, 44
Masařík · 60

Matějková · 3, 12
Matyášek · 34
Mayer · 21
Michalová · 53
Mikeš · 7, 25, 28
Miková · 33
Mikšanová · 14, 56, 59
Mikulcová · 45
Milat · 25
Moore · 35

N

Nagata · 30
Nedvídková · 20
Němec · 4, 36, 45
Norris · 3, 12
Nortier · 58

O

Omelková · 44

P

Páca · 56
Páca Jr · 56
Paleček · 6, 8
Palička · 40
Palme · 24
Pantůček · 43, 65
Papoušek · 28
Pavelka · 54, 63
Pavlová · 30
Pečinka · 6
Pechová · 20, 42
Pejchalová · 29
Pernisová · 24
Petřek · 64
Pilousová · 65
Pivoňková · 6
Pokorná · 57
Poljaková · 59
Pospíšilová · 31
Prodělalová · 32
Provazníková · 57
Pruša · 20, 42
Přecechtělová · 17
Příbyl · 16
Pšikal · 18
Ptáček · 45

R

Reková · 23
Relichová · 42, 54
Rittich · 32, 48, 61
Rodák · 18
Rupertová · 44, 51
Ruzgas · 38
Růžičková · 53
Rýdlová · 3, 11, 14, 58
Rychtera · 39

Ř

Řepková · 47, 49

S

Sapelnikova · 38
Schánilec · 29
Scheller · 22
Schmeiser · 52, 58, 62
Schrumpfová · 33
Skalická · 34
Skládal · 16, 22, 38
Skleničková · 34
Skříšovská · 33
Solná · 38
Sopková · 52
Soudková · 61
Stiborová · 3, 11, 13, 14, 41, 44, 51, 52, 56,
58, 59, 62
Stratilová · 44
Suchá · 56

Š

Šámalová · 35
Šerý · 7, 10, 28
Ševčík · 10
Ševčíková · 60, 67
Šimánek · 36
Šimek · 7, 10
Široký · 21
Šmajš · 3, 12
Šmarda · 60, 67, 68
Šmardová · 68

Španová · 32, 48, 61
Štaif · 10

T

Tesařík · 18
Trnková · 9, 60, 66
Tůmová · 20
Turánek · 19

U

Ulrichová · 36

V

Vacek · 9, 60, 64, 66
Valentová · 36
Válková · 23
Váňová · 37
Vobecký · 63
Vostal · 31
Vrtílek · 66
Vyskot · 21, 25

W

Weinstock · 3, 12
Wimmerová · 26

Y

Yansanjav · 36
Yoong Lim · 34

Z

Zadina · 42
Zahradníčková · 68
Zachová · 27
Zdráhal · 15, 17, 37, 68
Zimmer · 43
Zvolský · 7

Ž

Žákovská · 29, 31



Laboratorní přístroje
Enzymy, reagentie, PCR
Gelová dokumentace
Spektrofotometrie a fluorometrie
Elektroforetické gely a markery
IVF program
Sklo a plasty

kancelář Praha:

East Port Praha
Rubličova 1/969
161 00 Praha 6

BEZPLATNÁ TELEFONNÍ LINKA: 800-100529

tel.: 235 31 81 77

fax: 233 31 24 28

přístrojová technika - Marcel Kunay: 602-570015

molekulární biologie - Mgr. Ondřej Ptáček: 602-200982

eastport@eastport.cz

eastport@login.cz

kancelář Brno:

tel: 51735 38 36

fax: 51735 38 36

molekulární biologie - Mgr. Petr Ryšávka: 724-241350

eastport@eastport.cz

eastport@login.cz

www.eastport.cz

CHEMOS CZ, s.r.o.



Worldwide Trade with Chemicals, Life Science Products and Laboratory Equipment; Information Sourcing, Business Arrangements, Web Advertising

Chemos Cz, spol. s.r.o.

Sterboholská 28
CZ-10200 Prague 10 / Czech Republic
Phone: +420 272 701 793
+420 2 702 847
Fax: +420 272 705 485
email: info@chemos-group.cz

Chemos GmbH

Werner von Siemens Str. 3
D-93128 Regenstauf / Germany
Phone: +49 9402 9336 0
Fax: +49 9402 9336 13

email: sales@chemos-group.com

www.chemos-group.cz



Zastupujeme

Invitrogen™ corporation (BRL® Life Technologies and Invitrogen™ brand products)
GIBCO® Cell culture (Invitrogen corporation)
Kodak® scientific imaging system
Techne (Cambridge) Limited
Scie-Plas® Ltd.
Amresco® Inc.
Herolab GmbH
WPA Ltd.

Kancelář pro Českou Republiku

Plzeňská 552/265
155 00 Praha 5
Tel: 251 626 019
Fax: 271 769 852
E-mail: : krd@krd.cz

www.krd1.cz



BIOTECH



5 let jsme tu pro Vás
BIOTECH

OPTICON MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

od 755 000,- Kč



Genetica

Are you ready for the Real-Time Revolution?

Dual labeled probes
FRET probes
Molecular Beacons



Rotor-Gene[™] Real-Time Revolution

low copy mRNA
isolation



FastPrep

Real-Time Setup



CAS-1200



Real-Time Analysis



Rotor-Gene



TTTTTTT
AAAAAAA-mRNA

Dynabeads

www.genetica.cz



Hot start Taq
Reverse transcriptase
RT and QRT-PCR kits



ACGATTCTGACAATGeneTiCATAGCT

ILABO spol. s r.o.

Laboratorní technika do Vaší laboratoře

**Ilabo spol. s r.o.
Boršovská 2591
697 01 Kyjov**

tel.: +420 629 620 471

fax: +420 629 620 471

gsm: +420 602 562 960

ilabo@cmail.cz

www.cmail.cz/ilabo

Diagnostics



Research

Molecular Biology
Gene Expression and Functional Genomics
Cell biology and Immunochemistry
Biochemistry
Disease and Drug Research

Industry

Biochemicals for Diagnostics
Industrial Applications

Systems

Lightcycler
MaqNA Pure LC
Rapid Translation System
Lumi Imager

Address

Roche s.r.o.
Diagnostic Division
Dukelských hrdinů 52
170 00 Prague 7

Phone: 420-2-20382 555

FAX: 420-2-20382 538

E-Mail: dalimil.zurek@roche.com

www.roche-applied-science.com



SIGMA-ALDRICH



Sigma-Aldrich s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8

tel 246 003 200, fax 246 003 291, e-mail: czecustsv@europe.sial.com

www.sigma-aldrich.com

Sigma-Aldrich s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8
tel: 420 246 003 200, fax: 420 246 003 291, e-mail: czecustsv@europe.sial.com
www.sigma-aldrich.com

Roche s.r.o., Diagnostic Division, Dukelských hrdinů 52, 170 00 Praha 7
tel: 420-2-20382 555, fax: 420-2-20382 538, e-mail: dalimil.zurek@roche.com
www.roche-applied-science.com

Ilabo spol. s r.o., Boršovská 2591, 697 01 Kyjov
tel.: 420 629 620 471, fax: 420 629 620 471, gsm: 420 602 562 960, e-mail: ilabo@cmail.cz
www.cmail.cz/ilabo

KRD Molecular Technologies, Plzeňská 552/265, 155 00 Praha 5
tel: 251 626 019, fax: 271 769 852, e-mail: krd@krd.cz
www.krd1.cz

Chemos Cz, spol. s r.o., Štěrboholská 28, 102 00 Praha 10
tel: 420 272 701 793, 420 2 702 847, fax: 420 272 705 485, email: info@chemos-group.cz
www.chemos-group.cz

Knihkupectví MALÉ CENTRUM, Kotlářská 2, 611 37 Brno
tel: 420 541 129 202 (prodej), 420 541 129 544, 420 541 129 630 (kancelář)
fax: 420 541 129 630, email: mcentrum@sci.muni.cz
www.malecentrum.sci.muni.cz

East Port, Rubličova 1/969, 161 00 Praha 6
BEZPLATNÁ TELEFONNÍ LINKA: 800-100529
tel.: 235 31 81 77, fax: 233 31 24 28, email: eastport@eastport.cz, eastport@login.cz
kancelář Brno, tel: 51735 38 36, fax: 51735 38 36
www.eastport.cz

Biotech a.s., Služeb 4, Praha 10, 108 52
tel a fax: 420 272 701 739, email: biotech@biotech.cz
www.biotech.cz

GeneTiCA s.r.o., Služeb 4, Praha 10, 108 52
tel a fax: 02/72 7010 55, email: genetica@genetica.cz
www.genetica.cz