

# SBORNÍK

## XVII. BIOCHEMICKÝ SJEZD

### Praha 7.–10. září 2000

Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulovú biológiu pri SAV ve spolupráci se Společností klinické biochemie ČLS JEP a Fakultou elektrotechnickou ČVUT Praha

#### *Vážené kolegyně a vážení kolegové,*

*Je mi ctí přivítat vás na XVII. biochemickém sjezdu, který je již tradičně společným setkáním zejména českých a slovenských biochemiků. Hlavními organizátory jsou Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii a Slovenská společnost pro biochemii a molekulární biologii. Jsem rád, že se s námi setkávají i členové Společnosti klinické biochemie ČLS JEP a Fakulty elektrotechnické ČVUT, kteří se také na organizaci sjezdu podíleli.*

*Snažili jsme se trochu změnit obvyklou strukturu programu sjezdu a zařadit do něj témata zdánlivě snad poněkud odlehlá. Domnívám se ale, že postupné prorůstání oborů a tematik vede k tvorbě nových koncepcí ve vědě, a že je třeba ve vzájemných diskusích přicházet s novými pohledy na problematiku etablovaných oborů. Přál bych si, abychom na naše setkání častěji zvali kolegy specialisty v oborech biochemii poněkud vzdálenějších.*

*Jak víte, udílí Společnost při příležitosti sjezdu cenu Bio-tech za nejlepší soubor prací publikovaných za poslední dva roky. Musím říci, že stejně jako minule i letos jsme byli obeláni vynikajícími soubory prací. Autoři byli vesměs mladí biochemici a jejich publikace mohou soutěžit s tím nejlepším co se v Evropě produkuje. Dostali jsme šest přihlášek a výbor Společnosti na svém zasedání dne 2. května měl velmi obtížnou povinnost vybrat jednoho vítěze. Stal se jím RNDr. Pavel Souček, Csc. ze Státního zdravotního ústavu, který předložil soubor prací na téma Studium úlohy cytochromů P450 v karcinogenezi. Všechny ostatní soubory prací by si též zasloužily ocenění. Obeslaná témata byla: Akumulace těžkých kovů geneticky upravenou biomasou, Diagnostika metabolických poruch purinů a pyrimidinů kapilární elektroforézou, Směrování protinádorové terapie a překonání rezistence, Mitochondriální odpráhuující proteiny a Komplexní studie genetických souborů podmiňujících hyperhomocysteinémii. Autorům, kteří své publikace do soutěže poslali velmi děkuji.*

*Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii změnila poněkud od svého vzniku v roce 1993 svou působnost.*

*Reagovala tak na změněné podmínky celospolečenské, které ovšem výrazně ovlivnily podmínky vědecké práce. Hlavním posláním Společnosti již není organizování symposií a konferencí, které v minulosti sloužily zejména ke kompenzaci naší izolace od vědy v zahraničí. Společnost dnes spíše zprostředkovává vědeckým pracovníkům, především těm mladým, možnosti získání stipendií na pobyty v zahraničí a na účast na mezinárodních setkáních. Na organizaci mnoha akcí domácích i mezinárodních se ovšem naše Společnost stále podílí.*

*Prostřednictvím Společnosti jsou všichni její členové členy Federace evropských biochemických společností (FEBS), Mezinárodní unie biochemiků a molekulárních biologů (IUBMB) a Evropské molekulárně biologické konference (EMBC a EMBO). To členům umožňuje žádat od těchto organizací různé druhy stipendií a podpor na pořádání odborných akcí. Doporučuji všem, aby pravidelně sledovali naši internetovou stránku (<http://csbmb.img.cas.cz/>), kde lze najít odkazy na většinu relevantních informací.*

*Důležitou aktivitou Společnosti je vydávání Bulletinu. Je však otázka, zda jeho současná forma nezastarala a zda bychom neměli uvažovat o případné změně buď na biochemický časopis nebo naopak na jednoduchý informační leták.*

*Na všechny své aktivity si musíme dnes buď peníze vydělat nebo je získat formou kompetitivních grantů či od sponzorů a mecenášů. To není vůbec jednoduché a děkuji tajemnici Společnosti Ing. Krumlové za její úspěšnou snahu v tomto směru.*

*V příštím roce budeme volit nový výbor. Volbu opět provedeme korespondenčně. Připravte se na to prosím, promluvte se svými kolegy, a až budete vyzváni navrhnete dobré odborníky, kteří ovšem musí být připraveni ve výboru aktivně pracovat. Využívám této příležitosti, abych poděkoval všem biochemikům, kteří se aktivně zúčastňují života Společnosti.*

Václav Pačes  
předseda ČSBMB

## 01 STUDIUM ÚLOHY CYTOCHROMŮ P450 V KARCINOGENEZI

PAVEL SOUČEK

Vítěz soutěže o Cenu ČSBMB za rok 2000

Odborná skupina biotransformací, Centrum HPNP, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Cytochrom P450 (dále jen CYP) je důležitým enzymem, který metabolizuje chemické látky, se kterými lidé neustále přichází do styku. Jedná se o léčiva, kontaminanty životního prostředí i látky těla vlastní, např. hormony, prostaglandiny a cholesterol. U člověka bylo zatím odhaleno více než 20 různých enzymatických forem CYP, jež se navzájem podobají strukturou, ale velmi se liší spektrem substrátů, které metabolizují.

V práci<sup>1</sup> souboru byla detailně prostudována lidská forma CYP2A6. U CYP2A6 byl nalezen genetický polymorfismus, neboli existence tzv. slabých a silných metabolizátorů. CYP2A6 navíc metabolizuje celou řadu velmi zajímavých substrátů – např. je hlavním enzymem metabolizujícím nikotin u lidí. V rámci projektu popsaného ve zmíněné práci byl CYP2A6 poprvé na světě exprimován v *Escherichia coli*. Protein CYP2A6 byl purifikován a spektrálně charakterizován. Enzymatická aktivita CYP2A6 byla optimalizována v rekonstituovaném systému. Byly vyprodukovány unikátní protilátky proti CYP2A6, které velmi efektivně inhibují jeho aktivitu. Uvedený expresní systém cytochromu P450 2A6 je ideální k testování metabolismu nových léčiv, jedním z mála dostupných nástrojů jak ověřit význam genetických polymorfismů 2A6 u lidí, je vhodný pro sledování metabolické aktivity prokarcinogenů na mutagenní produkty a použitelný pro biotechnologii, např. pro produkci modrého barviva indiga<sup>2</sup>, což může přinést i komerční využití. Protilátky mají využití při skríningu hladiny a aktivity 2A6 v lidských buněčných frakcích.

Během práce s CYP2A6 byla vytvořena nová, rychlá a velmi citlivá metoda na stanovení metabolismu markerového substrátu CYP2A6 kumarinu pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Tato metoda najde využití při skríningu *in vitro* i *in vivo* aktivity CYP2A6 u lidí, čili může být aplikována ve farmakologii a toxikologii. Validace metody a její využití je popsáno v práci<sup>3</sup>.

Některé substráty jsou CYP metabolizovány na velmi reaktivní produkty, které mohou poškozovat DNA i proteiny a vést až k mutagenезi a karcinogenезi. Proto byly studovány schopnosti různých forem CYP metabolizovat substráty, které jsou významné z hlediska průmyslové expozice (benzen, dichlorbenzeny) a vytvářet z nich reaktivní produkty schopné poškozovat DNA i proteiny. Výsledky naznačily, že především lidská forma CYP2E1 je zodpovědná za vznik kovalentní vazby na DNA a proteiny a také byl zjištěn vliv genotypu tohoto enzymu na kinetické parametry enzymatických reakcí<sup>4,5</sup>.

Úloha izoenzymů CYP v metabolismu benzenu a následná tvorba produktů toxických pro buňku byla dále studována pomocí sledování účinků jednotlivých metabolitů benzenu na poškození funkce izoenzymů CYP, tvorby reaktivních kyslíkových radikálů a peroxidace lipidů<sup>6</sup>. Výsledky naznačily, že benzen je v játrech metabolizován na produkty poškozující funkci CYP, přičemž citlivost jednotlivých izoenzymů CYP

se značně liší. Produktem, zodpovědným za poškození CYP a dalších mikrosomálních proteinů, je především benzochinon. Hlavním mechanismem destrukce zjevně není tvorba kyslíkových radikálů ani iniciace peroxidace lipidů, ale přímá kovalentní vazba benzochinonu na proteiny včetně CYP. Velice závažný je fakt, že citlivost lidských izoenzymů CYP vůči benzochinonu je podstatně větší než u izoenzymů izolovaných z laboratorních potkanů a proto je třeba posuzovat zdravotní rizika plynoucí z expozice benzenu mnohem přísněji.

Další projekt se zabýval studiem exprese izoforem CYP v biologických preparátech – jaterních mikrosomálních frakcích u miniprasat a lidí<sup>7</sup>. Imunochemické stanovení hladiny exprese, izoenzymů CYP a jejich aktivit ukázalo, že játra miniprasat obsahují velice podobné aktivity a hladiny CYP proteinů jako lidé a především, že celkový metabolický profil prasečích jater je srovnatelný s lidským. Toto zjištění je v literatuře unikátní a jeho význam roste zejména vzhledem k úvahám o možné transplantaci prasečích jater lidem a použití prasečích hepatocytů k podpoře jater před vlastní transplantací (bioarteficiální liver). Navíc podle našich výsledků miniprasata představují ideální model na testování metabolických cest, protože, na rozdíl od potkanů, u miniprasat není třeba enzymy CYP indukovat a vytvářet tak nefysiologický stav v organismu zvířete.

Práce<sup>8-10</sup> popisují výsledky sledování genetických polymorfismů biotransformačních enzymů včetně CYP a smysl studia, který spočívá především v možnosti posoudit individuální vnímavost k působení karcinogenů na lidský organismus.

Práce na projektech byla financována granty Interní grantové agentury MZ ČR 1850-5 a NL6095-3.

### LITERATURA

(Seznam příspěvků do soutěže o Cenu ČSBMB)

1. Souček P.: Arch. Biochem. Biophys. 370, 190 (1999).
2. Gillam E. M. J., Aguinaldo A.-M., Notley L. M., Kim D., Mundowski R. G., Volkov A. A., Arnold F. H., Souček P., DeVoss J., Guengerich F. P.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 265, 469 (1999).
3. Souček P.: J. Chromatogr. B, 734, 23 (1999).
4. Nedelcheva V., Gut I., Souček P., Frantík E.: Chem-Biol. Interact. 115, 53 (1998).
5. Nedelcheva V., Gut I., Souček P., Tichavská B., Týnková L., Mráz J., Guengerich F. P., Ingelman-Sundberg M.: Arch. Toxicol. 73, 33 (1999).
6. Souček P.: Chem-Biol. Interact. 121, 223 (1999).
7. Anzenbacher P., Souček P., Gut I., Hrubý K., Anzenbacherová E., Svoboda Z., Květina J.: Drug Metab. Dispos. 26, 56 (1998).
8. Souček P., Šarmanová J., Gut I.: Zdravotnické noviny 27, 8 (1999).
9. Vodička P., Bastlová T., Osterman-Golkar S., Vodičková L., Peterková K., Souček P., Šarmanová J., Farmer P. B., Lambert B., Hemminki K.: Mutat. Res. 445, 205 (1999).
10. Somorovska M., Jahnova E., Tulinska J., Zamecnikova M., Sarmanova J., Terenova A., Vodickova L., Liskova A., Vallova B., Soucek P., Hemminki K., Norppa H., Hirvonen A., Tates A. D., Fuortes L., Dusinska M., Vodicka P.: Mutat. Res. 428, 255 (1999).

## 02 ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN THE INVESTIGATION OF BIOLOGICAL OBJECTS

GIORGIO SEMENZA<sup>a,b</sup> and ANJA VINCKIER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Biochemistry, ETH-Zentrum, Postfach 35, CH-8092 Zürich, Switzerland, <sup>b</sup>Dipartimento di Chimica e Biochimica Medica, Università di Milano, Via Saldini 50, I-20133 Milano, Italy

Scanning Probe Microscopies (SPM) have rapidly become established techniques in (mainly) inorganic surface science. Their use in biochemistry/biology is only a few years old. The SPM which is at the moment most promising is Atomic Force Microscopy (AFM), although for a number of reasons images of biological materials reach only molecular resolution at best; but, as AFM is possible without prior denaturation of the macromolecule(s), it can allow to follow biological phenomena in the imaging and/or non-imaging mode in real time under quasi “physiological” conditions (i.e. in aqueous buffers, at room temperature, etc.)

In order to offer our contribution to these two approaches – imaging and non-imaging AFM investigations of biological macromolecules – we have first developed new, large atomically flat surfaces (Au(111), (Ref.<sup>1,2</sup>), onto which self-assembled monolayers of  $\omega$ -substituted alkyl-thiols (or disulfide) form spontaneously. The S–Au bond is half as strong as a covalent C–C bond. The  $\omega$ -function allows for much versatility: typically a *N*-hydroxysuccinimide function at this position forms a highly reacting “carpet”, binding proteins, liposomes, substituted nucleic acids via reaction with primary amino groups<sup>3,4</sup>. The native – biological material is not brought into solution by either changes in pH or ionic strength. This has allowed e.g. to follow in real time the disassembly of clathrin cages in the fluid cell<sup>4</sup>. These Au(111) surfaces are thus valuable alternatives to other very flat surfaces, such as mica.

As to non-imaging modes, AFM allows measuring antigen/antibody interaction forces (with the protein pairs bound to the tip and the substrate, respectively, via Au(111) covered by *N*-hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers<sup>5</sup>). Protein/protein interactions can also be studied with other substrates (e.g. GroEL bound to mica<sup>6</sup> if the ionic strength is not too high, etc.

Mechanical, e.g. elastic properties can be investigated by AFM, the Young modulus ranging between 0.5 MPa (cartilage) or less (liposomes) to ca. 3 MPa (microtubules<sup>7</sup>) and to more than  $22 \times 10^9$  Pa (mica) (for a short review, see<sup>8</sup>).

These and additional examples of potential usefulness of AFM will be summarised.

### REFERENCES

- Hegner M., Wagner P., Semenza G.: Surf. Sci. 291, 39 (1993).
- Wagner P., et al.: Langmuir 11, 3867 (1995).
- Wagner P., Hegner M., Kern P., Zaugg F., Semenza G.: Biophys. J. 70, 2052 (1996).
- Wagner P., Kern P., Hegner M., Ungewickell E., Semenza G.: FEBS Lett. 356, 267 (1994).
- Dammer U., Hegner M., Anselmetti D., Wagner P., Dre-

ier M., Huber W., Guntherodt H. J.: Biophys. J. 70, 2437 (1996).

- Vinckier A., Gervasoni P., Zaugg F., Ziegler U., Lindner P., Groscurth P., Pluckthun A., Semenza G.: Biophys. J. 74, 3256 (1998).
- Vinckier A., et al.: J. Vac. Sci. Technol. B 14, 1427 (1996).
- Vinckier A., Semenza G.: FEBS Lett. 430, 12 (1998).

## 03 KLÚČOVÝ PROBLÉM BIOLOGICKEJ EVOLÚCIE: PRECHOD OD RNA SVETA K DNA SVETU

MARTA KOLLÁROVÁ

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Počas evolúcie RNA bola pravdepodobne prvou existujúcou triedou makromolekúl. V prvej fáze evolúcie RNA mala jedinou funkciu autoreplikácie. Neskôr usporiadanie stavebných jednotiek nukleových kyselín umožnilo nielen autoreplikáciu vlastnej molekuly, ale aj vytváranie špecifických štruktúr iných molekúl – proteínov. Pre vznik DNA mali rozhodujúcu úlohu dva proteíny s katalytickou funkciou – ribonukleotidreduktáza, ktorá katalyzuje tvorbu deoxyribonukleotidov a reverzná transkriptáza katalyzujúca prepis informácie z RNA do DNA.

Zatiaľ čo ribóza a ribonukleotidy mohli existovať za primitívnych podmienok na Zemi, pretože ribóza vzniká medzi mnohými produktami reakcií formaldehydu a ribonukleozidy sa tvoria zahriatím purínových báz s ribózou v prítomnosti anorganických solí, ani intenzívny výskum tvorby biomolekúl za abiotických podmienok neobjavil doteraz žiadnu chemickú cestu pre tvorbu deoxyribonukleotidov.

Deoxyribonukleotidy vznikajú redukciou zodpovedajúcich ribonukleotidov. Táto reakcia je katalyzovaná enzýmom ribonukleotidreduktázou (RNR). Produkty reakcie, 2'-deoxyribonukleotidy, nie sú tvorené žiadnou inou biosyntetickou cestou *de novo*. Z tohto dôvodu má proces redukcie ribonukleotidov rozhodujúcu úlohu pri syntéze DNA a delení buniek. Redukcia ribonukleotidov nie je jednoduchý, ale postupný proces, pri ktorom dochádza k prenosu vodíka z NADPH najskôr na malú ditiolovú bielkovinu tioredoxín a z tioredoxínu na ribonukleotidy. Prvý proces katalyzuje enzým tioredoxínreduktáza a druhý ribonukleotidreduktáza.

Aktivita RNR bola potvrdená u všetkých doteraz skúmaných organizmov. Tieto enzýmy odrážajú jednotu života práve tak, ako polymerázy nukleových kyselín alebo ribozomálny aparát. Najprv boli popísané dva typy RNR. Prvý typ je reprezentovaný enzýmom izolovaným z *Escherichia coli* kultivovanej za aeróbných podmienok a druhý z baktérie *Lactobacillus leichmannii*. V súčasnosti sú popísané štyri typy tohto enzýmu, ktoré sa prekvapujúco odlišujú požiadavkami na kofaktory napriek ich centrálnej úlohe v metabolizme (železo, koenzým B12, mangán, horčík, *S*-adenozylmetionín) a úrovnou fosforylácie ribonukleotidov, ktoré využívajú ako substráty. Štruktúru koenzým B12-závislých RNR reprezentovaných enzýmom *L. leichmannii* predstavuje jednoduchý polypeptidový reťazec. Fe-závislé RNR reprezentované *E. coli* majú podjednotkovú štruktúru vytvorenú z nerovnako veľ-

kých polypeptidových řetězců<sup>1</sup>. Pravděpodobně velké podjednotky RNR vytvářejí rodinu původních proteinů s mnohonásobné nukleotid-viažucími místami. Asociácia podjednotiek pripomína viac vzťah apoenzým–koenzým než podjednotkovú štruktúru enzýmu. Predpokladá sa, že B12-závislé RNR vznikli prvé ako primitívne katalyzátory syntézy deoxyribonukleotidov. Tento názor sa však nedá celkom zosúladiť s fylogenetickým stromom bakteriálneho sveta. Toto by vyžadovalo poznať prebiotickú existenciu kobalt-obsahujúcich korinoidov. Tieto mohli vzniknúť súbežne s príbuzným porfyrinovým systémom, ale nevyskytovali sa pravdepodobne všade, pretože kobalt je zriedkavý prvok a navyše korinoidné koenzýmy sú rozkladané svetlom. Čo sa týka železa a horčíka sú prinajmenšom stotisíckrát a tisíckrát frekventovanejšie na zemskom povrchu a väzba s proteínom je regenerovaná celou škálou biochemických katalyzovaných reakcií.

Napriek odlišnej proteínovej štruktúre majú RNR mnohé vlastnosti podobné. Na základe experimentálnych výsledkov sa predpokladá, že všetky doteraz známe ribonukleotidreduktázy uskutočňujú túto reakciu rovnakým mechanizmom, ktorý má charakter zložitej radikálovej reakcie. Tiež všetky štyri ribonukleotidy sa viažu na rovnaké aktívne miesto enzýmu, pričom špecifita naviazania určitého ribonukleotidu je modulovaná naviazaním určitého modulátora na regulačné (alosterické) miesta enzýmu.

Z hľadiska evolúcie by jedným z vysvetlení mohlo byť, že prirodzené vlastnosti chémie redukcie ribonukleotidov vnútili tieto podobnosti do oddelene sa vyvíjajúcich enzýmov konvergentnou evolúciou. Ďalšia alternatíva predpokladá, že tieto proteíny mali spoločného predka, z ktorého vznikli divergentnou evolúciou prispôbením sa na špecificky meniace sa požiadavky prostredia. Na základe štúdia vlastností jednotlivých typov ribonukleotidreduktáz viac autorov podporuje práve túto možnosť. Najsilnejším argumentom pre divergentnú evolúciu zo spoločného predka je unikátny mechanizmus alosterickej regulácie pre redukciu ribonukleotidov vo všetkých štyroch triedach enzýmu. V každom prípade ich substrátová špecifita je kontrolovaná naviazaním efektorových nukleotidov do alosterického miesta a všetky typy reduktáz odpovedajú rovnakým spôsobom na danú efektorovú molekulu, napríklad rozdielnym proteínovým štruktúram. Prvý enzým pravdepodobne vznikol pred fotosyntézou a mohol byť podobný enzýmom, ktoré boli objavené v organizmoch schopných rásť za anaeróbných podmienok. Tento enzým získal unikátny reakčný a kontrolný alosterický mechanizmus, ktorý dnes reguluje substrátovú špecifitu všetkých známych ribonukleotidreduktáz. Po objavení kyslíka na Zemi sa začali vyžadovať nové mechanizmy pre tvorbu radikálov a začali sa vyvíjať ďalšie typy enzýmov. Pravdepodobne však vznik týchto enzýmov je zodpovedný za premenu „sveta RNA“ na „svet DNA“ (cit.<sup>2,3</sup>).

Streptomycéty ako objekt štúdia sú zaujímavé nielen z hľadiska komplexného cyklu morfolologickej diferenciácie, ale aj z evolučného hľadiska, pretože sú zaradené do skupiny evolučne mladších baktérií, ktoré sú príkladom konvergentnej evolúcie medzi prokaryotickými baktériami a eukaryotickými hubami, ktoré sú príčinou ich výnimočných vlastností<sup>4</sup>. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli pre štúdium procesov a vlastností takých enzýmov, ktoré sú kľúčové pre tento organizmus. Naším cieľom bola snaha prispieť k objasneniu syntézy deoxyribonukleotidov v kmeni *Streptomyces aureofaciens*, ktorý

je producentom antibiotika chlórtracyklínu. Stanovenie charakteristických vlastností proteínov zúčastňujúcich sa redukcie ribonukleotidov na zodpovedajúce deoxyribonukleotidy – ribonukleotidreduktázy, tioredoxínu a tioredoxínreduktázy, je príspevkom k štúdiu ich evolúcie.

*Táto práca bola podporená v rámci grantu VEGA 1/7252/20.*

## LITERATÚRA

1. Stubbe J.: Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 2723 (1998).
2. Reichard P.: Science 260, 1773 (1993).
3. Reichard P.: TIBS 22, 81 (1997).
4. Fierro J. F., Parr F., Quiross L. M., Hardisson C., Salas J. A.: FEMS Microbiol. Lett. 41, 283 (1987).

## 04 BIOCHEMICKÉ A MOLEKULOVÉ STUDIE PORUCH METHIONINOVÉHO CYKLU U ČLOVĚKA

VIKTOR KOŽICH

*Ústav dědičných metabolických poruch, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2*

Cykus methioninu slouží u savců mimo jiné k syntéze *S*-adenosylmethiononu (AdoMet) a cysteinu, recyklaci homocysteinu zpět na methionin a k udržování homeostasy jednoduhlíkatých zbytků. Prvním krokem cyklu je syntéza AdoMet, který je využíván ve více než stovce různých transmethylačních reakcí či při syntéze polyaminu. *S*-Adenosylhomocystein (AdoHcy) vzniklý při transmethylacích je hydrolyzován na adenosin a homocystein (Hcy). Homocystein se dále může zpracovávat dvěma různými metabolickými cestami – transsulfurací nebo remethylací. Transsulfurace – u savců ireverzibilní – začíná kondenzací Hcy se serinem za katalytického působení cystathionin beta-synthasy (CBS), následnými kroky za podpory dalších enzymů vzniká cystein, glutathion, taurin a anorganický sulfát. Remethylace naproti tomu vrací molekulu Hcy zpět do methioninového cyklu, donorem methylové skupiny může být methyltetrahydrofolát nebo betain. Na remethylaci se podílí řada enzymů, mimo jiné methionin synthasa a methionin synthasa reduktasa (MTRR). Methioninový cyklus je regulován na různých úrovních, od úrovně transkripční až po vzájemně koordinované ovlivňování aktivity enzymu obou metabolických cest účinkem AdoMet.

U člověka je známá řada geneticky podmíněných onemocnění, u nichž je prokazatelně porušený metabolismus methioninu či homocysteinu. Poměrně vzácné jsou různé formy homocystinurie; tato skupina nemocí je typická autosomálně recesivním způsobem dědičnosti, deseti- až třicetnásobně zvýšenými koncentracemi celkového homocysteinu v plazmě a těžkým klinickým postižením. Mírně zvýšené koncentrace Hcy v plazmě (maximálně 2× nad horní hranici referenčního rozmezí) jsou naproti tomu velmi časté u řady běžných nemocí, např. u aterosklerózy, thromboembolie či u některých komplikací těhotenství. Naše skupina ve spolupráci s dalšími pracovišti systematicky studuje genetické faktory u vybraných klinických situací.

Pro pochopení fyziologických dějů v methioninovém cy-



klu naše skupina studovala vybrané vlastnosti dvou genů, a to CBS a MTRR. Kompletní strukturu genu pro CBS jsme zjistili sekvenováním 28 kbp úseku 21. chromosomu, určili jsme hranice všech 23 exonů, našli jsme celkem 7 polymorfních míst a zjistili jsme prevalenci variantních alel v těchto lokusech v české populaci; dále jsme analyzovali strukturu a výskyt alternativně sestřižených izoform mRNA pro CBS v různých tkáních. U genu pro MTRR jsme zjistili strukturu a tkáňově specifický výskyt alternativně sestřižených izoform mRNA, tyto izoformy jsme zaklonovali do prokaryotického expresního vektoru pCW a MTRR exprimovanou v *E. coli* nyní charakterizujeme po stránce enzymologické. V genu pro MTRR jsme našli dosud nepopsaný polymorfismus a zjistili jsme jeho prevalenci v české populaci.

Naše skupina se dále věnovala zevrubné charakterizaci souboru 23 českých a slovenských pacientů s homocystinurií, způsobenou deficitem CBS nebo MTRR. U pacientů jsme analyzovali klinické projevy nemoci, zjišťovali jsme změny v koncentraci metabolitu methioninového cyklu a analyzovali jsme mutace na úrovni genomové DNA i mRNA. Po stránce klinické jsou čeští a slovenští pacienti s homocystinurií velmi podobní pacientům jiného etnického původu. Studie metabolitu prokázala u pacientů zvýšenou koncentraci AdoMet, AdoHcy a Hcy v krvi, sníženou koncentraci cysteinu a serinu v plazmě a sekundární poruchy metabolismu folátů a vitamínu B12. Přes výrazně sníženou koncentraci cysteinu nebyl u pacientů prokazatelný deficit glutathionu v krvi, rovněž jsme nenalezli změny v koncentraci sulfanů a sulfidů v krvi. V dostupných vzorcích krve a fibroblastů jsme charakterizovali

celkem 24 nezávislých CBS alel a našli jsme 9 mutací. Polovina všech alel nesla jednu ze dvou běžných mutací – I278T nebo IVS11-2 A>C. Podrobně jsme charakterizovali chování RNA během sestřihu u dvou alel, které obsahují předčasné terminační kodon a které jsou odbourávány mechanismem nonsense mediated decay. Dále jsme charakterizovali 3 nezávislé MTRR alely a našli jsme 2 mutace; znalost mutací jsme využili i pro prenatalní diagnostiku v jedné rodině.

Poslední oblastí zájmu naší skupiny je analýza genetických faktorů, souvisejících s methioninovým cyklem, u komplexních nemocí. Pro pochopení mechanismů spojených s mírnou hyperhomocysteinémií jsme vyšetřili klinicky, biochemicky a geneticky 270 pacientů s koronarograficky prokázanou atherosklerosou věnčitých tepen a 550 kontrol. Všechny osoby jsme podrobili zátěžovému testu s methioninem a ve vzorcích krve před a po zátěži jsme stanovili vybrané metabolity methioninového cyklu, včetně glutathionu, dále vitamíny a běžné biochemické parametry. V podsouboru osob jsme dále analyzovali markery entotheliální dysfunkce a oxidativního stresu. U všech pokusných osob nyní zjišťujeme genotypy v lokusech pro CBS, MTRR, methylenetetrahydrofolát reduktasu a methionin synthasu. Po shromáždění všech údajů budeme data analyzovat pomocí parametrických a neparametrických statistických metod. Hlavním cílem studie bude zjištění, zda varianty v analyzovaných genech přispívají ke vzniku atherosklerosy a zda mohou být potenciálním léčebným cílem.

*Prezentované studie byly podporovány granty IGA MZ M-26-3, GA ČR 0476 a GA UK.*

## 01 CIZORODÉ ELEMENTY V GENOMECH

JAN PAČES<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Ústav molekulární genetiky AV ČR Flemingovo n. 2, 166 37 Praha 6, <sup>b</sup>Centrum molekulární genetiky VŠCHT, Technická 3, 160 00 Praha, 6

Předmětem genomiky je komplexní analýza celých genomů nebo jejich velkých, do jisté míry samostatných částí, například megaplasmidů nebo chromosomů. V tabulce I jsou uvedeny velikosti genomů vybraných představitelů různých tříd organismů. Nepostradatelnou součástí genomiky jsou nástroje bioinformatiky, kterými je jednak skládána konečná nukleotidová sekvence genomu z částečných sekvencí jednot-

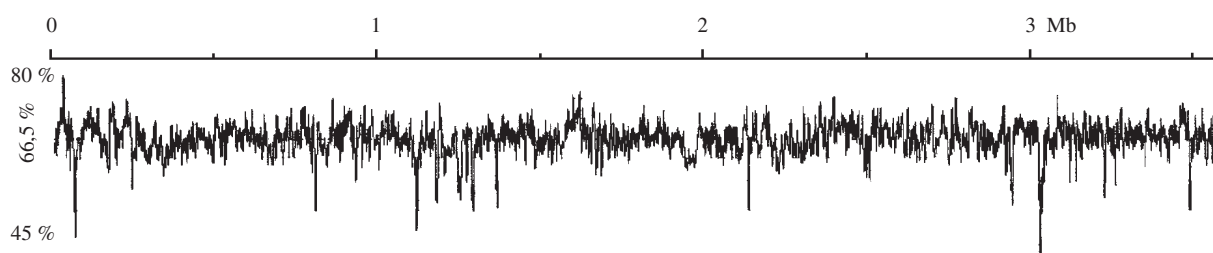
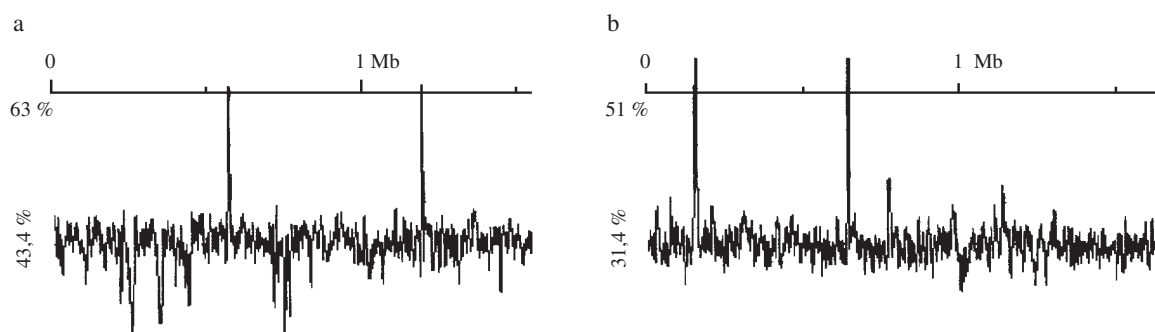
livých subklonů, a dále je výsledná sekvence analyzována na přítomnost genů, regulačních elementů a dalších charakteristických rysů.

Z tabulky I je zřejmé, že dědičná informace je v prokaryotických (bakteriálních) genomech uspořádána podstatně ekonomičtěji než v genomech eukaryotických (srv. velikosti genomů s počtem residentních genů). Extrémním případem v tabulce I je lidský chromosom 21, kde se v celkovém počtu 33,5 miliónů párů basí našlo jen 225 genů. To je dáno jednak přítomností intronů v eukaryotických genech, ale zejména přítomností negenové nekódující DNA (například repetitivních nukleotidových sekvencí). U člověka jen asi 3 % DNA kóduje proteiny. Analýza dokončených a rozpracovaných genomových projektů ukazuje na značnou plasticitu genomů. Ta je pravděpodobně důsledkem horizontálního přenosu DNA

Tabulka I

Charakteristika vybraných genomů

Druh	Organismus	Velikost genomu (bp)	Počet genů v genomu
Aktinobakterie	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4 411 529	4 397
Modrozelené řasy	<i>Synechocystis</i>	3 573 470	3 215
Gram-pozitivní bakterie	<i>Bacillus subtilis</i>	4 214 814	4 221
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	518 073	503
Proteobakterie	<i>Escherichia coli</i>	4 639 221	4 397
Spirochety	<i>Borrelia burgdorferi</i>	910 724	1 279
Archebakterie	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2 178 400	2 456
Houby	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 069 313	6 548
Hlístice	<i>Caenorhabditis elegans</i>	97 000 000	19 000
Člověk	<i>Homo sapiens</i> Chromosom 21	33 500 000	225
	<i>Homo sapiens</i> Chromosom 22	34 400 000	679

Obr. 1. Profil GC genomu bakterie *Rhodobacter capsulatus*. Oblasti se sníženým obsahem GC obsahují geny virového původuObr. 2. Profily GC genomů bakterií *Aquifex aeolicus* (a) a *Methanococcus jannaschii* (b). Oblasti se zvýšeným obsahem GC obsahují cizorodé geny

ale také vnitrogenomových přesunů a reorganizací DNA. Pozůstatky těchto událostí lze při bližším zkoumání nalézt například ve formě cizorodých genů, zejména genů virového původu, transpozonů a úseků DNA s vysokou homologií k nepřibuzným nebo jen vzdáleně příbuzným organismům.

My jsme analyzovali nukleotidové sekvence bakteriálních i eukaryotických genomů na přítomnost cizorodých elementů s cílem blíže charakterizovat jejich podstatu a distribuci v genomech. Na obrázku 1 je znázorněn profil obsahu guaninu a cytosinu (GC) v námi sekvenovaném genomu bakterie *Rhodobacter capsulatus*. Průměrný obsah GC DNA této bakterie je 66,5 %, ale úseky DNA obsahující vždy několik genů nebo jejich pozůstatků mají obsah GC výrazně nižší. Tyto geny jsou vesměs virového nebo transpozonového původu. Další cizorodé geny usídlené v genomu této bakterie lze identifikovat na základě preferenčního zastoupení jiných kodónů než je tomu u *R. capsulatus*. Obrázek 2 ukazuje podobný případ pro bakterie *Methanococcus jannashii* a *Aquifex aeolicus*, které mají genom s obsahem GC nízkým a kde lze identifikovat cizorodé geny na základě vybočení obsahu GC k vyšším hodnotám.

Na přítomnost cizorodých elementů jsme analyzovali také ty části lidského genomu, které jsou přístupné v databázi a identifikovali jsme množství genů většinou retrovirového původu. Tyto elementy lze kategorizovat do několika tříd. Vytvořili jsme databázi retrovirových elementů v lidském genomu, která je na internetové adrese <http://herv.img.cas.cz>

Podpořeno grantem MŠMT VS96074.

## 02 COMPUTER-BASED PREDICTION OF EXOGENOUS GENE CLUSTERS AND ITS TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY IN *RHODOBACTER CAPSULATUS* SB1003 GENOME

HYNEK STRNAD<sup>a,b</sup>, PAVEL ULBRICH<sup>a,b</sup>, JAN PAČES<sup>a,b</sup>, VĚRA HEJKALOVÁ<sup>a,b</sup>, and VÁCLAV PAČES<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Center for Molecular Genetics, Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>b</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Science, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague, Czech Republic

In the course of the *Rhodobacter capsulatus* SB1003 genome project special attention was paid to DNA regions with conspicuously different GC-content and/or dicodon usage. *R. capsulatus* SB1003 is a purple nonsulfur bacterium with the 3.7 Mbp chromosome and a 133 kbp plasmid. Its DNA has an average GC content of 67 %. We developed computer programs that evaluate GC content, dicodon use and gene length across the entire chromosome and plasmid. Using these programs several DNA regions were identified as belonging to exogenous nonbacterial elements. Genes so identified were translated into corresponding proteins and these proteins were compared with the Swissprot protein database. Most of the genes and gene clusters thus found were shown to be of viral origin. Except of one case all these viral clusters are integrated in the vicinity of tRNA genes. The reason may be that the

tRNA genes are highly transcribed and thus available for integration with a higher incidence compared to other genome parts.

The transcription units were identified for individual viral clusters. Transcription activity is determined by Northern blotting of total *R. capsulatus* RNA with PCR probes. This study should lead to identification of transcriptionally active parts of viral clusters with the prospect of identification of genes responsible for inhibition of virulency in integrated viruses.

## 03 PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOIC ACIDS IN *RHODOBACTER CAPSULATUS*

PAVEL ULBRICH<sup>a,b</sup>, HYNEK STRNAD<sup>a,b</sup>, VĚRA HEJKALOVÁ<sup>a,b</sup>, and VÁCLAV PAČES<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Center for Molecular Genetics, Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>b</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Science, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague, Czech Republic

Poly 3-hydroxyalkanoates (PHAs) are macromolecules synthesized by many gram-positive and gram-negative bacteria. PHAs are accumulated as discrete granules to levels as high as 90 % of the cell dry weight and are generally believed to play a role as a sink for carbon and reducing equivalents and as a storage material for the bacterial cell. These molecules show material properties that are very similar to some common plastics, such as polypropylene, with one important difference, i.e. its biodegradability. For the economical production of PHAs various bacterial strains, either wild type, or recombinant, and new fermentation strategies were developed, but the price of such preparations is still approximately ten times higher compared to synthetic materials. However, an important feature of these bacterial products may be the possibility to develop from them new types of polymers with specific properties. We therefore investigate bacterial production of PHAs and its regulation.

During the *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 sequencing project several genes were identified that are involved in PHA synthesis. The three genes that are considered to be indispensable for PHA biosynthesis, namely the genes *phaA* (encoding  $\beta$ -ketothiolase), *phaB* (encoding acetoacetyl-CoA reductase), and *phaC* (encoding PHA synthase) were found in the genome of *Rhodobacter*. *PhaA* and *phaB* genes are not linked to *phaC*. *PhaC* is a part of the genome region that consists of four genes probably also involved in PHA production. This region shows a very strong homology with the operon found in *Paracoccus denitrificans*. In this bacterium the function of the three genes was predicted and partially confirmed by functional analysis. These genes are *phaC*, the gene which product is responsible for accumulation of PHAs into cell granules and the third gene is a transcriptional regulator of this granule forming. The role and function of the fourth identified gene from *R. capsulatus* and *P. denitrificans* are still unknown.

The nutritional and bioenergetic versatility of *R. capsulatus*, coupled with its ability to produce large amounts of PHAs make it an attractive model for the study of PHA production.

#### 04 ANALYSIS OF *ALCALIGENES SP. A8* PLASMID DNA

VĚRA HEJKALOVÁ<sup>a,b</sup>, PAVEL ULBRICH<sup>a,b</sup>,  
HYNEK STRNAD<sup>a,b</sup>, and VÁCLAV PAČES<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Center for Molecular Genetics, Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>b</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Science, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague, Czech Republic

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are xenobiotics seriously polluting the environment. They are only slowly decomposed to chlorbenzoic acids. Soil bacterium *Alcaligenes sp. A8* was found to degrade chlorbenzoic acids, especially 2,5-dichlorbenzoic acid to less poisonous compounds. It was found earlier, that DNA of *Alcaligenes sp. A8* consists of a chromosome and a large plasmid. The genes encoding enzymes involved in the PCBs degradation pathway (especially those that cleave the benzene ring converting chlorbenzoic acids into three-carboxylic acids) are situated directly on the plasmid DNA.

We analyze the *Alcaligenes sp. A8* plasmid with the aim to characterize genes involved in the degradation reactions. For this the plasmid DNA was obtained in sufficient amount and purity for sequencing. This was achieved by combination of procedures circumventing the low copy number, the large size (90 kb) and low mechanical stability of the plasmid. DNA was then partially cut with *Sau3A* or *HinP1* restriction endonucleases and fragments of suitable length were isolated from agarose gels. DNA fragments were ligated with pUC19 and M13mp18 sequencing vectors linearized with *BamHI* or *AccI* restriction enzymes. After cloning the DNA is sequenced by Sanger dideoxy method with fluorescently labeled primers using A.L.F. Express sequencer (Pharmacia). The sequencing raw data are processed using the STADEN program package. We are now assembling individual contigs with the aim to sequence. The ultimate goal of the project is to characterize the degradative pathway, that can make possible to construct a bacterial strain with better properties for bioremediation processes.

#### 05 STUDIUM MUTACÍ V CENTRÁLNÍ KONZERVOVANÉ DOMÉNĚ DNA VAZEBNÉ PODJEDNOTKY ENDONUKLEASY *EcoR124I*

ŠTĚPÁNKA VEJSADOVÁ<sup>a,b</sup>, JÜRGEN FELSBERG<sup>a,b</sup>,  
KAMILA KOZÁKOVÁ<sup>a,b</sup> a MARIE WEISEROVÁ<sup>a,b</sup>

Mikrobiologický Ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4

Restriktivně modifikační systémy (R-M) se dělí na tři základní typy (I, II a III) podle jejich biochemických vlastností a genové organizace. Typ I představují velké multimerní enzymy složené ze tří podjednotek HsdR, HsdM, HsdS, zodpovědné za restriktci, modifikaci a rozpoznávání specifické sekvence na DNA (cit.<sup>1</sup>). R-M enzymy typu I se dále dělí na čtyři skupiny IA (*EcoKI*), IB (*EcoAI*), IC (*EcoR124I*, *EcoR124/3I*) a ID (*StySBLI*) na základě sekvenční homologie a genetické komplementace<sup>2</sup>. Pro všechny enzymy je společné, že sice methylují DNA ve specifickém rozpoznávacím

místě, ale místo štěpení není definováno a může být vzdáleno až několik kilobází od rozpoznávacího místa. Restriktivně modifikační systémy (R-M) chrání hostitelskou bakterii před infekcí cizorodou DNA tím, že ji štěpí (restringují), ale také zároveň methylací adenosylových nebo cytosylových zbytků ve specifické sekvenci chrání hostitelskou DNA před restriktci.

Není dosud zcela jasné jak jsou vzájemně regulovány restriktivní a methylační aktivity. Některé výsledky ukazují na možnost post-translační regulace<sup>3</sup>, jiné na úlohu cytoplazmatické membrány v lokalizaci těchto protichůdných aktivit<sup>4</sup>, což v důsledku patrně ovlivní sestavování podjednotek do funkčního komplexu<sup>5</sup>. Klíčovou úlohu v komplexním enzymu má podjednotka HsdS, neboť rozpoznává specifické místo na DNA díky variabilním doménám a zároveň hraje důležitou roli ve vazbě s ostatními podjednotkami prostřednictvím konzervovaných domén<sup>6</sup>.

Zaměřili jsme se na analýzu funkce centrální konzervované domény rozpoznávací podjednotky HsdS R-M systému *EcoR124I*. Tato podjednotka je složená ze dvou variabilních oblastí (TRD1, TRD2 – target recognition domains) a tří konzervovaných domén (dvě na N- a C-konci HsdS podjednotky, třetí doména se vyskytuje mezi TRD1 a TRD2 oblastí). Pomocí PCR mutagenese za přítomnosti různých koncentrací Mn<sup>2+</sup> jsme připravili soubor mutantů s náhodnými mutacemi v centrální oblasti genu *hsdS*. Komplementační analýzou založenou na kompetici dvou příbuzných R-M systémů *EcoR124I* a *EcoR124/3I* (cit.<sup>7</sup>) je bylo možné rozdělit na DNA-vazebné mutanty a mutanty, které ztratily schopnost vazby s ostatními podjednotkami. Z celkového počtu dvou set analyzovaných transformantů 71 vykazovalo mutantní fenotyp a z toho 61 mutantů nebylo vůbec schopných restriktce (tab. I). Všechny získané mutantní geny *hsdS* byly sekvencovány a kromě zmíněné komplementační analýzy je testována schopnost mutantních podjednotek HsdS vázat se s podjednotkou HsdM. Tato analýza je založena na skutečnosti, že samostatně se exprimující podjednotky HsdR a HsdM jsou detekovány v cytoplazmatické frakci (jsou solubilní), zatímco HsdS podjednotka je nesolubilní, proto je detekována v peletové (membránové) frakci<sup>8</sup>. Podjednotka HsdS je nalezena v cytoplazmatické frakci pouze při současné expresi s ostatními podjednotkami, kdy vazbou s nimi je solubilizována za tvorby funkční MTasy (vazba HsdS a HsdM podjednotky) nebo endonukleasy (vazba MTasy s HsdR podjednotkou)<sup>4</sup>.

Tabulka I  
Frekvence mutací získaných PCR-mutagenesí

Koncentrace Mn <sup>2+</sup>	Všechny mutace	Res-mutace
0,1 mM-Mn <sup>2+</sup>	20 %	17 %
0,5 mM-Mn <sup>2+</sup>	51 %	44 %

Jedinečná sbírka mutantů v podjednotce HsdS nám umožní studovat sestavování methylasy a endonukleasy u fenotypově zajímavých mutací. Srovnáním sekvenčních údajů s fenotypovým projevem a s výsledky biochemické analýzy *in vitro* chceme identifikovat významné aminokyselinové zbytky



ky zapojené v interakci podjednotek nebo ve vazbě na DNA. Analýza všech dat nám umožní prozkoumat způsob sestavování podjednotek těchto multifunkčních enzymů a jeho vliv na regulaci jejich funkce.

*Autoři děkují za finanční podporu grantům GA ČR 204/00/1251 a Wellcome Trust 054514/Z/98/Z/IGS/RC/CRD.*

## LITERATURA

1. Bickle T. A., Krüger D. H.: *Microbiol. Rev.* 57, 434 (1993).
2. Titheradge A. J., Ternent D., Murray N. E.: *Mol. Microbiol.* 22, 437 (1996).
3. Kulik E., Bickle T.: *J. Mol. Biol.* 264, 891 (1996).
4. Holubova I., Vejsadova S., Weiserova M., Firman K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 46 (2000).
5. Dryden D. T., Cooper L. P., Thorpe P. H., Byron O.: *Biochemistry* 36, 1065 (1997).
6. Cowan G. M., Daniel, A. S., Gann A. A., Kelleher J. E., Murray N. E.: *Gene* 74, 239 (1988).
7. Abadjieva A., Patel J., Webb M., Zinkevich V., Firman K.: *Nucleic Acids Res.* 21, 4435 (1993).
8. Patel J., Taylor I., Dutta C. F., Kneale G., Firman K.: *Gene* 1992, 112.

## 06 MUTACE OVLIVŇUJÍCÍ SESTAVOVÁNÍ PODJEDNOTEK RESTRIKČNĚ-MODIFIKAČNÍHO ENZYMU *EcoR124I*

MARIE WEISEROVÁ<sup>a</sup>, INGE HOLUBOVÁ<sup>a</sup>  
a KEITH FIRMAN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Mikrobiologický Ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>Biophysics Laboratories, School of Biological Sciences, University of Portsmouth, St. Michael's Building, White Swan Road, Portsmouth PO1 2DT, United Kingdom*

Restriktivně-modifikační (R-M) enzymy typu I se těší velkému zájmu, nejen pro svoji fyziologickou úlohu v zajišťování imunity bakterií proti infekci cizorodou DNA, ale také jako komplexní více-podjednotkové enzymy s neobvyklými vlastnostmi v rozpoznávání DNA na molekulární úrovni. Tyto enzymy se značně liší od jednodušších restriktivních enzymů typu II, běžně používaných v molekulární genetice. R-M enzymy typu I jsou kódovány třemi geny, *hsdR*, *hsdM* a *hsdS*. Produkty všech tří genů jsou nezbytné pro zabezpečení restriktivní funkce, zatímco pro modifikaci (methylaci) jsou postačující pouze produkty genů *hsdS* a *hsdM* (cit.<sup>1</sup>).

Klíčovou úlohu v komplexním enzymu má podjednotka HsdS, neboť rozpoznává specifické místo na DNA. Cílová sekvence na DNA je složena ze dvou částí oddělených nespecifickým mezerníkem; jedna je tvořena 3 páry bazí a druhá 4–5 páry bazí (např. u *EcoR124I* GAA N<sub>6</sub> PuTCG). Porovnáním primární sekvence genů *hsdS* příbuzných R-M systémů byla prokázána existence dvou vysoce homologních (konzervovaných) oblastí. Jedna uprostřed genu, kde je obklopena dvěma variabilními oblastmi a druhá na distální konci genu.

Gen *hsdS* systému *EcoR124I* má navíc konzervovanou doménu také na N-konci<sup>2</sup>.

Každá z variabilních oblastí je zodpovědná za rozpoznávání jedné části rozpoznávacího místa. Předpokládá se, že za interakce protein–protein a tedy za vazbu podjednotek jsou zodpovědné konzervované domény přítomné v podjednotce HsdS (cit.<sup>3</sup>).

Zaměřili jsme se na analýzu funkce centrální konzervované domény rozpoznávací podjednotky HsdS R-M systému *EcoR124I*. Pomocí PCR mutagenese za přítomnosti různých koncentrací Mn<sup>2+</sup> jsme připravili kolekci náhodných mutací v centrální oblasti genu *hsdS*. Pomocí komplementační analýzy založené na kompetici dvou příbuzných R-M systémů *EcoR124I* a *EcoR124/3I* (cit.<sup>4</sup>) je bylo možné rozdělit na DNA-vazebné mutanty a mutanty, které ztratily schopnost vazby s ostatními podjednotkami. Vzhledem k tomu, že mutace v podjednotce HsdS zatím vždy vykazovaly kompletně deficitní R-M fenotyp, zaujaly nás zejména mutace, které vykazovaly neobvyklý fenotyp R<sup>+</sup>M<sup>+</sup>

Sekvenční analýzou bylo u jedné z nich (mutace č. 72) nalezena záměna T→C v pozici 2594, což vede ke změně Trp<sup>212</sup> na Arg na rozhraní centrální konzervované oblasti a distální variabilní oblasti podjednotky HsdS (cit.<sup>5</sup>). Mutantní gen *hsdS* byl sestaven do methylasového operonu s genem *hsdM* a byla purifikována mutantní methylasa (Mtasa 72-4). Vazba mutantního enzymu na DNA byla sledována metodou gelové retardace (zpoždění) radioaktivně značených fragmentů DNA nesoucích rozpoznávací místo pro *EcoR124I*. Mutantní methylasa má výrazně poškozenou schopnost vazby na DNA. Teprve vytvoření komplexní endonukleasy přidáním purifikované podjednotky HsdR obnovilo schopnost enzymu vázat se na specifické rozpoznávací místo na DNA. Neschopnost purifikované Mtasy 72-4 methylat cílovou sekvenci potvrdilo změněnou schopnost vazby na DNA. Sestavení endonukleasy *in vitro* přidáním podjednotky HsdR obnovilo methylační funkci, ale pouze na poloviční aktivitu standardního enzymu.

Mutace HsdS72 je prvním popsáním příkladem tzv. „neklasické“ mutace v genu *hsdS* R-M systému *EcoR124I*. Tato mutace ovlivňuje sestavování endonukleasy tak, že enzym si zachová methylační aktivitu, ale není schopen štěpit DNA. Lokalizace mutace na konci centrální konzervované domény ukazuje na význam této oblasti ve vzájemné vazbě podjednotek při sestavování komplexního restriktivně-modifikačního enzymu.

*Tato práce byla podpořena granty GA ČR 204/96/1365 a Wellcome Trust 054514/Z/98/Z/IGS/RC/CRD.*

## LITERATURA

1. Hubáček J., Glover S. W.: *J. Mol. Biol.* 50, 111 (1970).
2. Kneale G. G.: *J. Mol. Biol.* 243, 1 (1994).
3. Cowan G. M., Daniel A. S., Gann A. A., Kelleher J. E., Murray N. E.: *Gene* 74, 239 (1988).
4. Abadjieva A., Patel J., Webb M., Zinkevich V., Firman K.: *Nucleic Acids Res.* 21, 4435 (1993).
5. Weiserova M., Firman K.: *Biol. Chem.* 379, 585 (1998).

## 07 PRE-MELTING OF SUPERCOILED DNA TOPOISOMERS OBSERVED BY TGGE

VIKTOR VÍGLASKÝ<sup>a</sup>, MARIÁN ANTALÍK<sup>b</sup>,  
JOZEF ADAMČÍK<sup>a</sup>, and DUŠAN PODHRADSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, P. J. Safarik University, Moyzesova 11, 041 54 Košice, <sup>b</sup>Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 043 53 Košice, Slovakia

Topological properties of DNA are essential for life. The geometric distortion of a supercoiled molecule means that the average shape and the frictional properties of the molecule are changed as a result of its topology. Electrophoresis separates DNA molecules on the basis of size and compactness; smaller and/or more compact molecules will migrate more rapidly through the matrix of the gel under the influence of the electric field. The resolving power of agarose gels for topoisomers is impressive, but unfortunately the range is limited, so that the more highly supercoiled species comigrate as a broad band. The major problem with one-dimensional gel electrophoresis is the relatively limited range over which migration is a function of topology. The traditional approaches to the study of linear DNA melting proved ineffective in this case. Resolution of topoisomers has been greatly improved with the recent use of two dimensional gel electrophoresis<sup>1</sup>. We have used temperature-gradient gel electrophoresis (TGGE) to measure the progress of local denaturation in the closed circular topoisomers DNA as a function of temperature and superhelicity,  $\sigma$ . Meanwhile very little is known about the formation of the melted regions in supercoiled DNA. The sample of DNA in TGGE experiment moves in different denaturing conditions during electrophoresis<sup>2,3</sup>. TGGE separates very sensitively covalently closed DNA of different structure. The pre-melting temperature of structural transition for any topoisomer is dependent on the value of superhelicity. The supercoiled topoisomers represent the system of molecules which is sensitive to the changes of temperatures. In the present investigation we examine the TGGE behavior of an extensive family of topoisomers of plasmid pBR322 (4361 bp) and pUC19 (2763 bp) over a temperature range of 25 to 75 °C. We find that a series of mobility transitions occurs as linking number and electrophoresis temperature are systematically varied and reveal the fine structure of pre-melting in closed circular DNA. These transitions are manifested as cyclic variations in mobility with increasing temperature. The marked differences in electrophoretic mobility between supercoiled and relaxed DNA molecules made it possible to observe the denaturation of each DNA topoisomer leading to topological relaxation. We have shown that thermal stability varies as a function of superhelical density for different topoisomers, the topoisomer with higher absolute value of superhelicity melts earlier than topoisomers with lower values. Thermal sensitivity of the highly supercoiled plasmids could play a biological important role in regulation of replication and expression under thermal stress of cells. The estimated melting temperature for plasmid with  $\sigma < -0.05$  is very significant because these temperatures for pre-melting are below the physiological temperatures<sup>4</sup>.

This study was supported in part by grants No. 5053 and 6116 from Slovak Grant Agency.

## REFERENCES

1. Wang J. C., Peck L. J., Becherer K.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, p. 85 (1983).
2. Lyubchenko Y. L., Shlyakhtenko L. S.: *Nucleic Acids Res.* 16, 3269 (1988).
3. Riesner D., Steger G., Zimmat R., Owens R. A., Wagenhöfer M., Hillen W., Vollbach S., Henco K.: *Electrophoresis* 10, 377 (1989).
4. Víglaský V., Antalík M., Adamčík J., Podhradský D.: *Nucleic Acids Res.* 28, (2000), in press.

## 08 THE ROLE OF THE TERMINAL MODIFICATIONS OF CAPSID PROTEIN OF MASON-PFIZER MONKEY VIRUS IN DIRECTING THE PARTICLE SHAPE

MICHAELA RUMLOVÁ<sup>a</sup>, ERIC HUNTER<sup>b</sup>,  
MILAN NERMUT<sup>c</sup>, IVA PICHOVÁ<sup>a</sup>,  
and TOMÁŠ RUML<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Dept. Biochem., Inst. Org. Chem. and Biochem., Acad. Sci., Prague, <sup>b</sup>Dept. Microbiol., Univ. of Alabama at Birmingham, <sup>c</sup>Natl Inst. for Biological Standards and Control, Potters Bar, U.K., <sup>d</sup>Dept. Biochemistry and Microbiology, ICT, Prague, Czech Republic

Expression of the M-PMV Gag precursor of Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) in *Escherichia coli* results in the assembly of capsids-like structures indistinguishable from those of infected mammalian cells. We have used this bacterial high expression system to investigate the structural requirements for assembly of M-PMV Gag precursor into capsids. a series of C- and N-terminal deletion mutants progressively lacking each of the mature Gag domains (MA-pp24/16-p12-CA-NC-p4) were constructed and expressed in *E. coli*. We have observed dramatic variation in the shape of particles formed in *E. coli* from individual constructs.

It was found that both CA and NC domains are necessary for assembly of macromolecular structures but that additional sequences N-terminal of CA are necessary for assembly of spherical capsids. The role of these N-terminal domains was not sequence-specific since both MA-CA-NC and p12-CA-NC polyproteins efficiently assembled into spheres. These residues appear to prevent a conformational change in which the N-terminal proline plays a key role, since expression of a CA-NC protein lacking this proline results in the assembly of spherical capsids in place of the sheets assembled by CA-NC. The extension of CA with the domain spanning the first zinc finger within the NC can functionally substitute whole NC domain suggesting that this region provides necessary interaction domain for the assembly. Several other extensions made have shown that the zinc finger domain *per se* is not crucial for this process. Merely extending the C-terminus of CA by six amino acids from NC, to regenerate the 13 amino

acid region predicted to be  $\alpha$ -helical in the M-PMV Gag precursor, was not sufficient in itself to modulate assembly of higher-order structures of CA. Instead, addition of six histidine residues at the C-terminus resulted in the assembly of protein sheets that resembled those of CA-NC suggesting that there is no specific sequence requirement and that this oligo-His sequence provides the necessary interaction domain for multimerization of CA.

*This work was supported by these grants GA ČR 203/00/1005 and 203/98/P151.*

### 09 C-TERMINAL EXTENSIONS OF CAPSID PROTEIN OF MASON-PFIZER MONKEY VIRUS DIRECT THE ASSEMBLY OF MACROMOLECULAR STRUCTURES

MICHAELA RUMLOVÁ<sup>a</sup>, ERIC HUNTER<sup>b</sup>,  
MILAN NERMUT<sup>c</sup>, IVA PICHOVÁ<sup>a</sup>,  
and TOMÁŠ RUML<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Dept. of Biochemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague, Czech Republic, <sup>b</sup>Dept. Microbiol., University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294, <sup>c</sup>National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, Herts, EN6 3QG, U.K., <sup>d</sup>Dept. of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague, Czech Republic

Expression of the Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) Gag precursor in *E. coli* results in the assembly of capsids-like structures indistinguishable from those of infected mammalian cells. We have used this high expression system to investigate the structural requirements for assembly of Gag derived proteins into capsids. A series of C- and N-terminal deletion mutants progressively lacking each of the mature Gag domains (MA-pp24/16-p12-CA-NC-p4) showed that both CA and NC domains are necessary for assembly of macromolecular structures. However, extension of CA with the domain spanning the first zinc finger can functionally substitute the NC domain suggesting that this region provides necessary interaction domain that is required for the assembly. Several other extensions made have shown that the zinc finger domain *per se* is not crucial for this process. Merely extending the C-terminus of CA by six amino acids from NC, to regenerate the 13 amino acid region predicted to be  $\alpha$ -helical in the M-PMV Gag precursor, was not sufficient in itself to modulate assembly of higher-order structures of CA. Instead, addition of six histidine residues at the C-terminus resulted in the assembly of protein sheets that resembled those of CA-NC suggesting that there is no specific sequence requirement and that this oligo-His sequence provides the necessary interaction domain for multimerization of CA.

The effect of Gag truncations on the intracellular localization of corresponding proteins is shown in Figure 1. This figure also schematically depicts the effect of C-terminal modifications of CA-NC fusion protein on the morphology of structures expressed and assembled in *E. coli*.

Construct name	Composition	Morphology	
Gag	MA PP p12 CA NC p4	Spherical particles	I.B.
Gag $\Delta$ p4	MA PP p12 CA NC	Spherical particles	I.B.
Gag $\Delta$ NC-p4	MA PP p12 CA	None	I.B.
MA-PP-p12	MA PP p12	None	I.B.
MA-PP	MA PP	None	
MA	MA	None	
Gag $\Delta$ MA	PP p12 CA NC p4	Spherical particles	I.B.
Gag $\Delta$ MA-PP	p12 CA NC p4	Spherical particles	I.B.
p12-CA-NC	p12 CA NC	Spherical particles	I.B.
CA-NC-p4	CA NC p4	Tubes/sheets	
CA-NC	CA NC	Tubes/sheets	
CA	CA	None	I.B.
CA-6A	CA CA6A		I.B.
CA-6His	CA CA6H	Tubes/sheets	
CA-6A6His	CA CA6A6H	Tubes/sheets	
CA-NC37	CA NC37	Tubes/sheets	
Pro(-)CA-NC37	CA NC37	Spherical particles	

Fig. 1. C-terminal deletion constructs of M-PMV Gag and modifications of CA-NC – their morphology in *E. coli*

### 10 N-TERMINAL RESIDUE OF CAPSID PROTEIN OF MASON-PFIZER MONKEY VIRUS DIRECTING THE PARTICLE SHAPE

MICHAELA RUMLOVÁ<sup>a</sup>, ERIC HUNTER<sup>b</sup>,  
MILAN NERMUT<sup>c</sup>, IVA PICHOVÁ<sup>a</sup>,  
and TOMÁŠ RUML<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Dept. of Biochemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague, Czech Republic, <sup>b</sup>Dept. Microbiol., University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294, <sup>c</sup>National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, Herts, EN6 3QG, U.K., <sup>d</sup>Dept. of Bioche-

mistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, 166 28 Prague, Czech Republic

Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) pre-assembles immature capsids in the cytoplasm prior to transporting them to the plasma membrane and subsequent budding. Expression of the M-PMV Gag precursor in microorganisms as *E. coli* or *Saccharomyces cerevisiae* results in the assembly of capsid-like structures indistinguishable from those of infected mammalian cells. We have used this bacterial high expression system to investigate the structural requirements for assembly of M-PMV Gag precursor into capsids. A series of C- and N-terminal deletion mutants progressively lacking each of the mature Gag domains (MA-pp24/16-p12-CA-NC-p4) were constructed and expressed in *E. coli* (Fig. 1). It was found that both CA and NC domains are necessary for assembly of

macromolecular structures but that additional sequences N-terminal of CA are necessary for assembly of spherical capsids. The role of these N-terminal domains was not sequence-specific since both MA-CA-NC and p12-CA-NC polyproteins efficiently assembled into spheres. These residues appear to prevent a conformational change in which the N-terminal proline plays a key role, since expression of a CA-NC protein lacking this proline results in the assembly of spherical capsids in place of the sheets assembled by CA-NC.

Figure 1 schematically shows the effect of the N-terminal truncations on the morphology of M-PMV related structures expressed and assembled in *E. coli*.

## 11 STRUCTURAL STUDY OF THE CAPSID PROTEIN OF MASON-PFIZER MONKEY VIRUS

JITKA BENEDÍKOVÁ<sup>a</sup>, IVA PICHOVÁ<sup>a</sup>,  
TOMÁŠ RUML<sup>b</sup>, and MICHAELA RUMLOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, <sup>b</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Prague Institute of Chemical Technology, 166 10 Prague 6, Czech Republic

Construct name	Composition	Morphology	
Gag	MA PP p12 CA NC p4	Spherical particles	I.B.
GagΔp4	MA PP p12 CA NC	Spherical particles	I.B.
GagΔNC-p4	MA PP p12 CA	None	I.B.
MA-PP-p12	MA PP p12	None	I.B.
MA-PP	MA PP	None	
MA	MA	None	
GagΔMA	PP p12 CA NC p4	Spherical particles	I.B.
GagΔMA-PP	p12 CA NC p4	Spherical particles	I.B.
p12-CA-NC	p12 CA NC	Spherical particles	I.B.
CA-NC-p4	CA NC p4	Tubes/sheets	
CA-NC	CA NC	Tubes/sheets	
CA	CA	None	I.B.
pro(-)CA	CA	Polymers?	I.B.
MA-CA-NC	MA CA NC	Spherical particles	I.B.
pro(-)CA-NC	CA NC	Spherical particles	I.B.
(P/A)CA-NC	CA NC	Spherical particles	I.B.
KDIF-CA-NC	CA NC	Spherical particles	I.B.
F-CA-NC	CA NC	Spherical particles	I.B.

Fig. 1. Deletion constructs of M-PMV Gag and their morphology in *E. coli*

Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) represents the prototype of type D retroviruses, characterized by the preassembly of its particles within the cytoplasm of infected cell. These immature particles are subsequently transported to the plasma membrane, where they are released by budding. During the budding process the viral encoded proteinase is activated and cleaves polyprotein precursors into the structural and enzymatic proteins. The genome of M-PMV is formed by four genes in the order 5'-gag-pro-pol-env-3', which are translated as polyprotein precursors: Gag, Gag-Pro, Gag-Pro-Pol and Env. The gag gene product encodes the structural proteins of the viral core. During maturation the Gag polyprotein precursor is proteolytically cleaved into the structural proteins: MA (matrix), pp24, p12, CA (capsid), NC (nucleocapsid) and p4.

In the mature viral particle the capsid protein forms the protein shell that surrounds the inner ribonucleoprotein. In order to obtain M-PMV CA protein for structural studies, the gene encoding this protein was cloned downstream of T7 promoter into bacterial expression plasmid pET22b.

CA3×STOP encodes gene for CA protein with a stop codon (UAA), CA 6His carries gene encoding CA protein extended with 6 histidines on its C-terminus and CA 6AA 6His, which encodes gene for CA protein C-terminally extended with the first 6 amino acids from NC sequence followed by 6 histidines. All these constructions were expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The purification procedures were developed for each of these CA proteins. The secondary structure of the purified proteins was studied by CD spectroscopy.

It is known that HIV-1 CA can multimerize and so contributes to Gag-Gag interactions. To investigate whether M-PMV CA is also able to form the multimeric structures *in vitro*, the cross-linking agent (EDC) was used.

This work is supported by these grants: GA ČR 203/98/P151, GA ČR 203/00/1005.



## 12 CHARACTERIZATION OF THREE FORMS OF PROTEINASE FROM MASON-PFIZER MONKEY VIRUS

HELENA BAUEROVÁ<sup>a</sup>, ALEŠ ZÁBRANSKÝ<sup>a</sup>,  
MICHAELA RUMLOVÁ<sup>a</sup>, ERIC HUNTER<sup>b</sup>,  
TOMÁŠ RUML<sup>a</sup>, and IVA PICHOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, <sup>b</sup>Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, USA

Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) originally isolated from a breast carcinoma of a rhesus monkey causes severe immunosuppressive diseases with pathology distinct from that associated with lentiviruses. M-PMV is a prototype of the D-type retroviruses in which the process of assembly and budding of immature viral particles are temporally and spatially unlinked. Thus, M-PMV provides an excellent system for identifying the role of individual viral proteins in assembly and maturation.

The genomic organization of M-PMV is similar to that of the most noncomplex viruses with four genes in the order 5'-gag-pro-pol-env-3'. Proteinase (PR), released by autocatalytic cleavage of Gag-Pro and Gag-Pro-Pol polypeptide precursors, catalyzes the processing of viral polyproteins to yield the structural proteins and enzymes of virion.

In retroviruses, usually only one proteolytically active form of proteinase exists. We have found that M-PMV PR exists *in vitro* in three forms displaying proteolytic activity. These forms arise by selfprocessing of 26 kDa proteinase precursor. The first cleavage at N-terminus of the precursor results in 17 kDa product (PR17) that is further cleaved at the C-terminus into 13 kDa form (PR13) and final 12 kDa form (PR12). Two of these forms, PR17 and PR13, were also identified *in vivo* in mature virions.

To study the role of PR autoprocessing and the importance of resulting individual forms in the life cycle of the virus we have mutated cleavage sites within the proteinase molecule. For analysis of Gag-polyprotein processing PR's mutants containing PR12/PR13 stop, PR17/PR13 Ile, PR13/PR12 Ile and PR17/PR12 Arg mutations were used. We have compared the time course of the Gag polyprotein processing by individual proteinases. We have also measured and compared kinetics data for cleavage of synthetic decapeptides, which map the cleavage sites in the Gag-polyprotein.

## 13 THE STUDY OF MATRIX PROTEINS OF MASON-PFIZER MONKEY VIRUS AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

JAN LIPOV<sup>a</sup>, MICHAELA RUMLOVÁ<sup>b</sup>,  
and TOMÁŠ RUML<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, The Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, <sup>b</sup>Department of organic chemistry and biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

The Mason-Pfizer Monkey Virus (M-PMV) is a prototype

of D-type retroviruses. Morphogenetic pathway of retroviral capsid formation represents the main difference between C- and D-type retroviruses. Unlike the immature capsid of D-type retroviruses is assembled from polyprotein precursors Gag in the specific place in cytoplasm and then transported to the plasma membrane of host cell, the C-type capsid is assembled at the plasma membrane. However, one of the crucial steps of the life cycle of both types of retroviruses is the targeting of polyprotein precursors Gag to the site of assembly. It is known that the matrix protein (MA), which forms the N-terminal part of polyprotein Gag, plays essential role during this process. MA is cotranslationally myristylated on its N-terminus in the host cell. MA protein plays also a role in other steps of retroviral life cycle – it probably serves as a transport signal of preintegration complex during its targeting to the host nucleus. It was shown that single point mutation in the matrix protein of M-PMV changes its morphogenesis from D- to C-type. The mutation preventing myristylation of MA protein had a dramatic effect on targeting of polyprotein precursors to the plasma membrane.

The aim of this work is to obtain the structural data of both nonmyristylated and myristylated forms of matrix proteins of M-PMV and HIV measured by NMR. We are also interested in mutant M-PMV matrix proteins (A18V, R55W, R55F). We could take assumption about structural domains of the matrix protein and their importance for particular functions of this protein from comparison of obtained data.

*E. coli* was used harbouring plasmid encoding myristoyl-transferase for expression of myristylated matrix proteins. The affinity chromatography of histidine tagged fusion proteins was used for purification. The information encoding the matrix protein and a part of the C-terminally adjacent protein sequence was cloned into the expression vectors. The sequence encoding oligohistidine was added in fusion to the gene yielding the C-terminal tag for purification of products on Ni-NTA agarose column. Following the washing of contaminating protein it was used specific M-PMV or HIV proteases to liberate pure matrix proteins from the column.

The differences between M-PMV and HIV myristylated Mas and their non-myristylated forms will be discussed.

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic, Grant No. 203/00/1005.

## 14 OPTIMALIZATION OF A TWO-PLASMID SYSTEM FOR THE IDENTIFICATION OF PROMOTERS RECOGNIZED BY RNA POLYMERASE CONTAINING SIGMA FACTOR $\sigma^E$ IN *ESCHERICHIA COLI*

BRONISLAVA ŘEŽUCHOVÁ,  
MARTA KAMODYOVÁ, and JÁN KORMANEC

Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic

The *E. coli* *rpoE* gene for  $\sigma^E$ , and two cognate promoters, *rpoEp*, and *degPp* were amplified and cloned in two-plasmid system for the identification of promoters recognized by a heterologous  $\sigma$  factor developed by our group. The system

worked with a modification also for this homologous  $\sigma$  factor gene.

Recently we developed a method for the identification of promoters recognized by particular  $\sigma$  factor of RNA-polymerase based on two compatible plasmid system<sup>1</sup>. The method supposed that *E. coli* RNA-polymerase core enzyme would interact with a particular heterologous  $\sigma$  factor expressed from one plasmid, and the resulting holoenzyme would recognize a promoter present in a library of chromosomal fragments cloned in the second compatible plasmid upstream of a reporter gene. We tried to optimize this method for detection of the promoters dependent upon homologous  $\sigma$  factor from *E. coli*. The method was tested using recently discovered extra heat-shock  $\sigma^E$ , and two cognate promoters, the *rpoEp* directing the *rpoE* gene, and *degPp* directing the *degP* gene encoding a periplasmic protease<sup>2</sup>. Using the chromosomal DNA from *E. coli* W3140 we have amplified by PCR the DNA fragments containing the whole *rpoE* gene and two cognate promoters. The *rpoE* gene was cloned under the control of a strong IPTG-inducible *trc* promoter in the plasmid pAC5mut2 (Ref.<sup>1</sup>), and promoters were cloned in the compatible plasmid pSB40 (Ref.<sup>1</sup>), upstream of the *lacZ $\alpha$*  reporter gene. The plasmids bearing the both promoters have been transformed parallelly to *E. coli* containing the pAC5mut2, and pAC-rpoE (with the cloned *rpoE* gene), respectively. The transformants have been selected on LBACIX plates<sup>1</sup> (with 1 mM-IPTG, and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  X-gal). However, we found out that the negative control (cells containing the plasmid pACmut2 and tested promoter) has been identified as blue colonies. The transformants containing the pAC-rpoE have not grown at all. Decreasing concentration of IPTG (as low as 0.05  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) was still toxic also in minimal M9 medium. However, LBACIX plates without IPTG worked well. Negative colonies were uncoloured, and positive colonies were dark-blue. Therefore, the low concentration of X-gal is sufficient for *trc* induction of *rpoE* expression in a non-toxic level, sufficient for promoter recognition.

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/7001/20.

## REFERENCES

1. Nováková R., Ševčíková B., Kormanec J.: *Gene* 208, 43 (1998).
2. Rouviere P. E., Penas A. D-L., Mecsas J., Lu C. Z., Rudd K. E., Gross C. A.: *EMBO J.* 14, 1032 (1995).

## 15 CLONING AND SEQUENCING OF A NEW POLYKETIDE GENE CLUSTER IN *STREPTOMYCES AUREOFACIENS* CCM3239

JANA BISTÁKOVÁ, BRONISLAVA ŘEŽUCHOVÁ,  
and JÁN KORMANEC

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences,  
Dúbravská 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

A new polyketide gene cluster (*pks1Sa*) was identified in *Streptomyces aureofaciens* CCM3239. Sequence analysis of a 5368 bp DNA fragment revealed six ORFs. Putative pro-

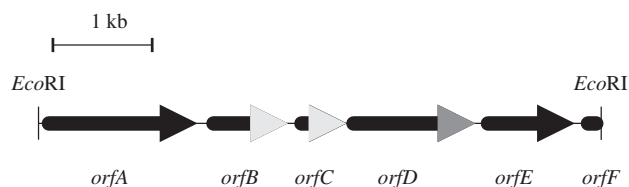


Fig. 1. Organization of *S. aureofaciens pks1Sa* gene cluster in 5368 bp *EcoRI* DNA fragment

teins, besides ORFB, showed high homology to important proteins for polyketide synthesis in *Streptomyces*. The *S. aureofaciens* strain with disrupted *orfD* gene produced spores with wild type pigmentation. The results indicate a role of this cluster in synthesis of a polyketide metabolite, and not in spore pigment synthesis.

*Streptomyces* are Gram-positive mycelial soil bacteria which produce a variety of antibiotics and biologically active molecules<sup>1</sup>. Polyketides are structurally diverse natural products (for instance antibiotics and spore pigments) synthesized by polyketide synthase enzymes, which catalyze repeated condensation cycles between acyl thioesters<sup>2</sup>. Using the *whiE* probe from *S. coelicolor* spore pigment gene cluster<sup>3</sup>, we cloned a 5368 bp *EcoRI* fragment in *S. aureofaciens*. Its sequencing revealed six convergent ORFs (Fig. 1). The ORFA (488 aa) had high homology to oxygenases from many *Streptomyces* polyketide gene clusters. The ORFB (215 aa) had low homology to transcriptional factors. The ORFC (110 aa) showed high similarity to cyclases, the ORFD (421 aa) to ketosynthases, the ORFE (404 aa) to chain length factors, and the incomplete ORFF shows similarity to acyl carrier proteins from *Streptomyces* polyketide gene clusters. We named this partial polyketide gene cluster *pks1Sa*. The organisation of these six ORFs is more similar to gene clusters for polyketide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*, as to gene clusters for spore pigments. Similarly, the ORFD (ketosynthase) is more related to all known antibiotic ketosynthases, as to spore pigment ketosynthases. In order to investigate the function of this gene cluster, the *orfD* gene was disrupted in *S. aureofaciens*. The disruption did not affect morphology and differentiation of *S. aureofaciens*. The disrupted strain produced spores with wild-type grey-pink pigmentation. Based on these results we assume that the cluster is not involved in spore pigment synthesis. It likely encodes genes for synthesis of a polyketide secondary metabolite.

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/7001/20.

## REFERENCES

1. Chater K. F.: *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 685 (1993).
2. Hopwood D. A.: *Chem. Rev.* 97, 2465 (1997).
3. Yu T-W., Hopwood D. A.: *Microbiology UK* 141, 2779 (1995).

## 16 IDENTIFICATION OF PUTATIVE PROMOTERS LIKELY RECOGNIZED BY THE LATE SPORULATION SIGMA FACTOR $\sigma^F$ IN *STREPTOMYCES COELICOLOR* A3(2)

BEATRICA ŠEVČÍKOVÁ and JÁN KORMANEC

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Using the method for the identification of promoters recognized by the late sporulation sigma factor  $\sigma^F$ , we have identified 9 positive DNA fragments from the genomic library of *Streptomyces*. Sequencing of the fragments and deletion analysis have suggested potential promoters exhibiting high similarity to the consensus sequence of *Bacillus subtilis* general stress-response sigma factor  $\sigma^B$ .

	– 35 region		– 10 region
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F6</sub>	GTTTAC	– N <sub>14</sub>	– GGGTAT
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F35</sub>	GTTGAA	– N <sub>14</sub>	– GGGAAA
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F42</sub>	GTTCAA	– N <sub>14</sub>	– GGTAAG
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F58</sub>	GTTTCA	– N <sub>14</sub>	– GGGCAA
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F81</sub>	GTTTAC	– N <sub>14</sub>	– TGGCAT
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F23</sub>	GTTTAT	– N <sub>15</sub>	– GGGGAC
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F40</sub>	GATTCA	– N <sub>14</sub>	– GGACAT
<i>S. coelicolor</i> P <sub>F132</sub>	GTTTCG	– N <sub>13</sub>	– GTATAT
<i>B. subtilis</i> $\sigma^B$	GTTTAA	– N <sub>12-14</sub>	– GGGTAT

Fig. 1. Comparison of the putative *S. coelicolor*  $\sigma^F$ -dependent promoters with the consensus sequence of promoters recognized by general stress response sigma factors  $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis*

*Streptomyces coelicolor* is Gram-positive mycelial soil bacteria undergoing a complex process of morphological differentiation<sup>1</sup>. Recently, we have established a method for identification of promoters recognized by a particular sigma factor of RNA polymerase<sup>2</sup>. The method assumed that *E. coli* RNA polymerase core enzyme would interact with a sigma factor heterologously expressed from one plasmid, and the resulting holoenzyme would recognize a promoter present in a library of chromosomal fragments cloned in the second compatible plasmid upstream of a reporter gene. In the present report we have used the method for identification of *S. coelicolor* promoters that are recognized by the sigma factor  $\sigma^F$  that has a role in the late stages of morphological differentiation in *S. coelicolor*<sup>3</sup>. Two *S. coelicolor* M145 genomic libraries in the promoter probe vector pSB40 were transformed to the *E. coli* containing compatible plasmid pAC-sigF1, having *sigF* gene under the control of a IPTG-inducible *trc* promoter of the plasmid pAC5mut2 (Ref.<sup>2</sup>). Using this procedure we have identified 9 independent positive clones being positive only in the background of *sigF*-encoded  $\sigma^F$  factor. The deletion analysis of the 8 fragments, and sequence analysis revealed a sequences, having high similarity to consensus sequence of promoters recognized by general stress-response sigma factors  $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis*<sup>4</sup>. Comparison of all the putative *sigF*-dependent promoters is shown in Fig. 1.

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/7001/20.

## REFERENCES

1. Chater K. F.: Annu. Rev. Microbiol. 47, 685 (1993).
2. Nováková R., Ševčíková B., Kormanec J.: Gene 208, 43 (1998).
3. Potúčková L., Kelemen G. H., Findlay K. C., Lonetto M. A., Buttner M. J., Kormanec J.: Mol. Microbiol. 17, 37 (1995).
4. Hecker M., Schumann W., Volker U.: Mol. Microbiol. 19, 417 (1996).

## 17 SIGMA FACTOR GENES *sigA* AND *sigB* IN *BREVIBACTERIUM FLAVUM* CCM 251

NORA HALGAŠOVÁ, GABRIELA BUKOVSKÁ, JOZEF TIMKO, and JÁN KORMANEC

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

We identified two genes encoding putative sigma factors, SigA and SigB, of RNA polymerase in *Brevibacterium flavum*. Sequence analysis revealed that a deduced amino acid

BfSigA	← VESSMVENNVAKKTAVAKKTARKTARKAAPRVATPLGVASESPI
BfSigA	SATPARSIDGTSTPVEAADTIETTAPAAKAPAAKPAKKVAKKT
BfSigA	1.1 ARKAPAKKTVAKKATTAKAAPATAKDENAPVDDDEENLAQDEQD
BfSigA	FDGDDFVDGIEDEDEDGVEALGEESEDEEDGSSVWDEDESAT
BfSigB	MTAPSTQDLATTEREVD
BfSigA	LRQARKDAELTASADSVRAYLKQIGKVALLNAEQEVSLAKRIEA
BfSigB	PGSRRGQTNDNPSQDLVRVYLNIGIKTALLTAEDEVELAQITIEV
BfSigA	GLYATHRMEEMEEAFAAGDKDAKLTPAVRDLRAIARDGRKAKN
BfSigB	GLYAEHLKNSSE - - - - - PLTRAMKRDLKVLAKDGKKARS
BfSigA	2.1 HLLLEANLRLVSLAKRYTGRGMFLDLIQEENGLIRAVEKFDY
BfSigB	HLLLEANLRLVSLAKRYTGRGMFLDLIQEENGLIRAMEKFDY
BfSigA	2.3 SKGYKFSTYATWWIRQAITRAMADQARTIRIPVHMVEVINKLGR
BfSigB	SKGFKFSTYATWWIRQAITRGMADQSRITIRLPHVLEQVVKLSR
BfSigA	IQRELLQELGREPTPQELSKEMDISEEKVLEIQQYAREPISLDQ
BfSigB	IKREKYQHLGREATNEELAEESGIEESKIEMLLRQSRDPVSLDM
BfSigA	3.2 TIGDEGDSQLGDFIEDSEAVVAVDAVSFTLLQDQLQDVLETLSE
BfSigB	PVGADDEEAPLGDFFIEDSEATDAESAVVAMRHSRDIRAVLNTLEP
BfSigA	4.1 REAGVVKLRFGLTDGMPRTLDEIGQVYGVTRERIRQIESKTMK
BfSigB	REQDVIRLRYGLDDGVPRTLQIGRRRFLSRERVRQIEREVMSK
BfSigA	→ LRHPSRSQVLRDYLD
BfSigB	LRDGERASRLREYAQ

Fig. 1. Comparison of the *B. flavum* SigA and SigB deduced proteins, with indicated homology to SigA and SigB proteins from *B. lactofermentum*<sup>2</sup>. Amino acids identical in BfSigA and BfSigB are in bold, amino acids different from those in *B. lactofermentum* SigA and SigB are underlined. The regions of the sigma factors are indicated above the sequences

sequence of SigA and SigB proteins shows greatest similarity to SigA and SigB from *B. lactofermentum*.

A genomic blot of chromosomal DNA from *B. flavum* CCM 251 after digestion with different restriction endonucleases has been hybridized with the DNA fragment originating from the *hrdB* gene of *Streptomyces aureofaciens*<sup>1</sup>. Two hybridizing bands were detected on the blot.

We have prepared two subgenomic libraries of *B. flavum* CCM 251 in *Escherichia coli* by cloning 0.8–4.8 kbp BamHI and 0.5–4.5 kbp HindIII fragments of *B. flavum* CCM 251 chromosomal DNA in the BamHI and HindIII site (respectively) of the pBluescriptIIKS<sup>+</sup> (Stratagene). The same *hrdB* probe as described above has been used for identification of the single positive clones after colony hybridization. Nucleotide sequencing of the positive clones revealed significant homology to the class of  $\sigma^{70}$ -like principal sigma factors, and shows greatest similarity to *sigA* and *sigB* genes from *B. lactofermentum*<sup>2</sup>. Sequence analysis of the complete sequence revealed two ORFs coding for gene products of 498 and 331 amino acid residues, respectively. We have designated them SigA and SigB. The *B. flavum* SigA and SigB show striking similarity to two *B. lactofermentum* counterparts. There are only 10 different amino acid residues in *B. flavum* SigA, and 1 residue in SigB.

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/6060/99 and partially by the VEGA Grant No. 2/7001/20.

## REFERENCES

1. Kormanec J., Farkašovsky M., Potúčková L.: *Gene* 122, 63 (1992).
2. Oguiza J. A., Marcos A. T., Malumbres M., Martín J. F.: *J. Bacteriol.* 178, 550 (1996).

## 18 CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE ~17 kbp GENOME FRAGMENT FROM BREVIBACTERIUM FLAVUM CCM 251 BACTERIOPHAGE BFK20

IGOR RAŠLÍK, GABRIELA BUKOVSKÁ, LUBOŠ KLÚČAR, ANDREJ GODÁNY, and JOZEF TIMKO

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

We have previously isolated and characterized the coryne-phage BFK20 which causes the lysis of *Brevibacterium flavum* CCM251 (Ref.<sup>1</sup>). This coryne-phage has noncontractible tail 200 nm long, 10 nm in diameter and polyhedral head 50 nm wide. Its genome consists of a linear double stranded DNA (lin. ds DNA) molecule of 44–45 kbp with cohesive ends.

The existence of bacteriophages in corynebacteria has been known for many years, but their complete nucleotide sequences have not been published yet. However, the complete genome sequences of several phages with lin. ds DNA were established. For example *Lactococcus lactis* bacteriophage b IL67 (22195 bp) (Ref.<sup>2</sup>), *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1 (19345 bp) (Ref.<sup>3</sup>), *Lactobacillus* phage  $\phi$ g1e (42259 bp) (Ref.<sup>4</sup>).

## BFK20

(44 700 bp)

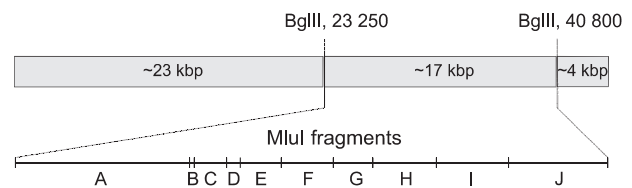


Fig. 1. Localization of BglIII (~23 kbp, ~17 kbp, ~4 kbp), BglIII-MluI (5005 bp, 2850 bp) and MluI (2070 bp, 1820 bp, 1172 bp, 1015 bp, 921 bp) fragments on the BFK20 genome

On base of restriction map of bacteriophage BFK20 DNA was isolated ~17 kbp BglIII fragment. After the restriction analysis, this fragment was cut by MluI and resulting fragments were made blunt and cloned into the SmaI linearized pBlue-scriptIIKS<sup>+</sup> vector. Recombinant plasmids contained inserts: 5.5 kbp; 3.5 kbp; 2.1 kbp; 2.0 kbp; 1.2 kbp; 1.0 kbp; 0.9 kbp.

The constructs were SacI/XbaI digested and treated with Exonuclease III to generate a series of unidirectional deleted subclones. The complete nucleotide sequences of MluI fragments (5005 bp, 2850 bp, 2070 bp, 1820 bp, 1172 bp, 1015 bp, 921 bp) were determined. Positions of these sequences on the 17 kbp fragment were determined by sequencing of the mutual transmissions from suggested oligonucleotides (Fig. 1).

We have detected 3 new MluI fragments (129 bp, 397 bp, ~1,3 kbp) and now we are working on completing and analysis of the final sequence of the 17 kbp fragment.

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/6060/99.

## REFERENCES

1. Koptides M., Barák I., Šišová M., Baloghová E., Ugorčáková J., Timko J.: *J. Gen. Microbiol.* 138, 1387 (1992).
2. Schouler C., Ehrlich S. D., Chopin M. C.: *Microbiology* 140, 3061 (1994).
3. Martin A. C., Lopez R., Garcia P.: *J. Virol.* 70, 3678 (1996).
4. Kodaira K. I., Oki M., Kakikawa M., Watanabe N., Hirakawa M., Yamada K., Taketo A.: *Gene* 187, 45 (1997).

## 19 CONSTRUCTION OF THE PROMOTER-PROBE VECTORS ON THE BASE OF PROMOTERLESS $\alpha$ -AMYLASE GENE

JANA UGORČÁKOVÁ, GABRIELA BUKOVSKÁ, and JOZEF TIMKO

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Promoter-probe vectors are important tools to study the expression of genes *in vivo*. Most of these promoter-probe vectors contained an antibiotic resistance gene as the reporter.



Morinaga<sup>1</sup> had constructed the vector, which carried promoterless cat reporter gene for determination of promoter strength. Kanamycin resistance reporter gene had been already used<sup>2,3</sup>.

We have constructed the new promoter-probe vectors for *E. coli* and corynebacteria containing the promoterless  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus subtilis* as a reporter, with and without the signal peptide. Vectors pJUPAE1 and pJUPAE2, respectively, are suitable for isolation of transcriptionally active fragments. Activity of  $\alpha$ -amylase can be easily detected as a visual effect on agar plates containing chromogenic substrate, or by direct measurement of  $\alpha$ -amylase activity. New promoter-probe vectors may be very useful for the study of corynebacterial promoters and terminators and also for the study of secretion process.

The presence of cloned signal peptide in our constructs is advantage in these experiments compare to previously constructed promoter-probe vector for corynebacteria, containing the promoterless *amy* gene from *Streptomyces griseus* as a reporter without a signal peptide<sup>4</sup>.

The fragment bearing the promoterless  $\alpha$ -amylase gene from the vector pHYamy318 was subcloned into the pBlue-scriptII SK+ to create plasmid pSKAE. Fragments carrying the missing sequence of structural gene with and without signal peptide was prepared by PCR method. Following steps of cloning are shown on the schema (Fig. 1).

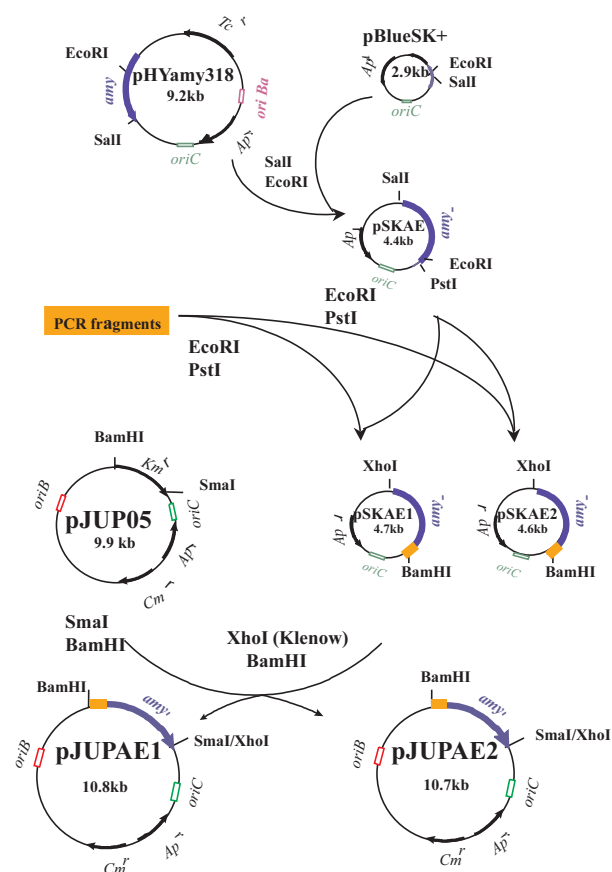


Fig. 1. Construction of promoter probe vectors; *oriE*, *oriC*, *oriBa* – origin for vegetative replication in *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* and *B. subtilis*, respectively

This work was supported by the VEGA Grant No. 2/6060/99.

## REFERENCES

1. Morinaga Y., Tsuchiya M., Miwa K., Sano K.: J. Biotechnol. 5, 305 (1987).
2. Barák I., Koptides M., Jucovič M., Šišová M., Timko J.: Gene 95, 133 (1990).
3. Cadenas R. F., Martín J. F., Gil J. A.: Gene 98, 117 (1991).
4. Cadenas R. F., Fernandez-Gonzalez C., Martín J. F., Gil J. A.: FEMS Microbiol. Let. 137, 63 (1996).

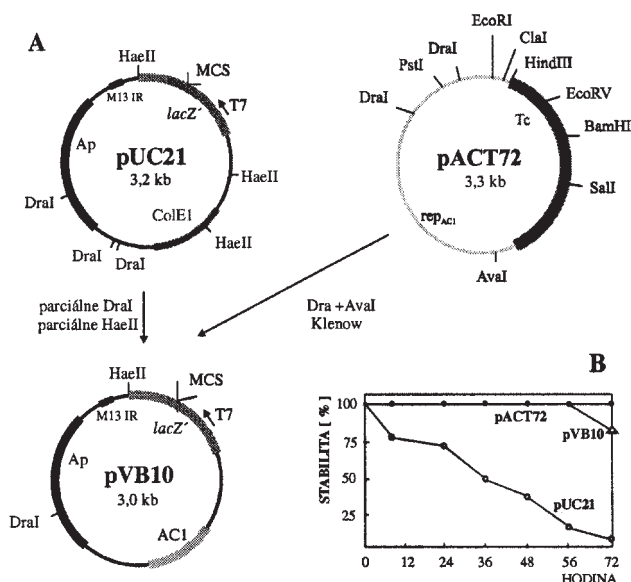
## 20 CHARAKTERIZÁCIA REPLIKÓNOV V PLAZMIDDOCH Z BUNIEK ACETOBACTER PASTEURIANUS

JOZEF GRONES, JÁN KRAHULEC, MARIÁN MAČOR a JÁN TURŇA

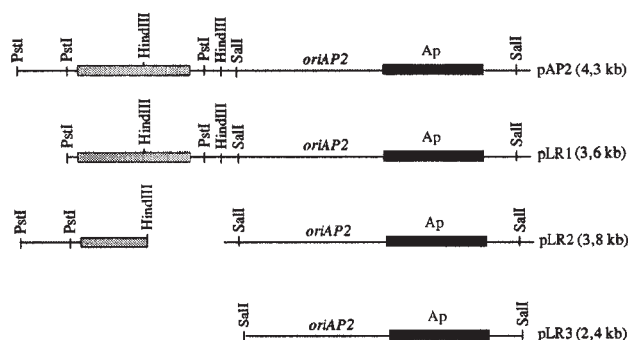
Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Bunky *Acetobacter* patria do skupiny gramnegatívnych baktérií schopných oxidácie rôznych organických substrátov. Zvýšený záujem o tieto baktérie je v dôsledku prítomnosti rôznych plazmidov, ktoré sú zdrojom nových poznatkov o mechanizme ich replikácie, ako aj zdrojom nových replikónov vhodných pre tvorbu klonovacích systémov<sup>1</sup>.

Z vybraných bakteriálnych kmeňov *Acetobacter pasteurianus* boli izolované a charakterizované dva plazmidové systémy. Z buniek *A. pasteurianus* 3612 sa izoloval plazmid pAC1 (19 kb) s replikónom AC1. Na najmenšom EcoRI fragmente (2,5 kb) bol identifikovaný a neskoršie sekvenovaný minimálny replikón v blízkosti génu ampicilínovej rezisten-



Obr. 1. A – Konštrukcia vektora pVB10, B – stanovenie stability vektora pVB10



Obr. 2. Mapovanie minimálneho replikónu v plazmide pAP2

cie. Pripravené vektory s AC1 replikónom boli využité ako shuttle vektory pre klonovanie do gram-negatívnych (*E. coli*, *Comamonas*, *Salmonella*, *Serratia*...) ako aj niektorých gram-pozitívnych baktérií (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*...) <sup>2,3</sup>.

Použitím AC1 replikónu bol pripravený klonovací a sekvenciačný vektor pVB1 (obr. 1A) a vektor pAPK514 obsahujúci  $P_L$  a  $P_R$  promótor bakteriofága lambda. Pripravené plazmidy sú stabilné pri kultivácii v neselektívnych kultivačných podmienkach (obr. 1B).

Z bakteriálneho kmeňa *A. pasteurianus* 2374 boli izolované tri plazmidy pAP1 (3,1 kb), pAP2 (4,5 kb) and pAP3 (8 kb). Všetky plazmidy kódujú gén rezistencie na kanamycín a plazmidy pAP2 a pAP3 aj gén rezistencie na ampicilín. Plazmidy boli separované a transformované do buniek *E. coli* DH1. V bunkách *Acetobacter* sú schopné koexistencie v jednej bunke naproti tomu v bunke *E. coli* sa správajú ako inkompatibilné plazmidy. Restričnou analýzou bol detekovaný minimálny replikón pAP1 (1,2 kb) a pAP2 (1,4 kb) na menšom Sall fragmente a neskoršie uskutočnená sekvenčná analýza plazmidov (obr. 2).

## LITERATÚRA

- Okomura H., Uozumi T., Beppu T.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 1011 (1985).
- Grones J., Kráľová A., Turňa J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 26 (1993).
- Grones J., Turňa J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 942 (1995).

21 AN ORIGIN OF DNA REPLICATION FROM STREPTOMYCETE PHAGE  $\mu$  1/6

ANDREJ GODÁNY and JARMILA FARKAŠOVSKÁ

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

A major aim in the study of *Streptomyces* species has been to understand the biosynthesis of secondary metabolites and to exploit genetic recombination for yield improvement or creation of new compounds. Bacteriophages have proved to

be useful tools not only in studying basic biological processes, but also in gene technology.

The  $\mu$  1/6 is a lytic streptomycete phage with a narrow host range. This phage is able to form plaques only on tetracyclin producing strains of *Streptomyces aureofaciens*<sup>1</sup>. Its genome consists of a linear double stranded circularly permuted DNA (36.2 kbp). According to its morphology  $\mu$  1/6 phage belongs to group B of Bradley's classification. Previous work has described the appearance of a silent restriction-modification system in *S. aureofaciens* resistant mutants after  $\mu$  1/6 infection<sup>2</sup>. It seems that  $\mu$  1/6 phage could play an interesting role in *S. aureofaciens* biology. That is why we continue to study this phage.

One of our interests has been focused on  $\mu$  1/6 replication. In order to localize the  $\mu$  1/6 origin of replication, SpH I and Sau 3A fragments of  $\mu$  1/6 DNA respectively, were cloned into the replicon probe vector pIMB 04 (Ref.<sup>3</sup>). Recombinant plasmids were used to transform *S. lividans* 66 strain. We obtained one SpH I fragment and one Sau 3A fragment, both able to sustain plasmid replication in *S. lividans* 66. According to the hybridization analysis these fragments did not share any homology. The nucleotide sequence of both fragments, which direct plasmid replication, was determined. Both sequences have been analyzed for open reading frames and for direct and inverted sequences indicative of replication origins.

Previous studies with  $\lambda$  phage have shown that sequences which enable plasmid replication may not be sufficient to initiate phage replication<sup>4</sup>. According to our results we suppose that SpH I fragment represents phage ori. But this fragment may not contain all features required for phage replication.

*This work was supported by VEGA grant No. 2/6060/99.*

## REFERENCES

- Kúdela O., Horváth L., Zelinka J.: *Biológia* (Bratislava) 39, 357 (1984).
- Godány A., Pristaš P., Oktavcová B., Farkašová J., Ziffová M., Ševčíková B.: *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 123 (1996).
- Godány A., Lacová B., Zelinka J.: *J. Basic. Microbiol.* 30, 729 (1990).
- Moore D. D., Denniston K. J., Blattner F. R.: *Gene* 11, 91 (1981).

22 DETERMINANT TELURIČITANOVEJ REZISTENCIE Z *ESCHERICHIA COLI*: ANALÝZA GÉNOV A TRANSKRIPCIARENÁTA KORMUŤÁKOVÁ<sup>a</sup>, LUBOŠ KLUČÁR<sup>b</sup>, JOZEF TIMKO<sup>b</sup> a JÁN TURŇA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina B2, 842 15, Bratislava,* <sup>b</sup>*Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovenská republika*

Na základe rozsiahleho skrínungu rôznych rezistencií pri štúdiu klinických kmeňov bol identifikovaný kmeň *Escheri-*

*chia coli*, označený KL53, rezistentný na teluričitanové ióny<sup>1</sup>. Determinat teluričitanovej rezistencie bol lokalizovaný na konjugatívnom plazmide (plazmid pTE53) a následne klonovaný do strednekópiového plazmidu pACYC184. Sekvenovaním determinantu bola získaná jeho úplná sekvencia (5221 bp). Sekvenčnou analýzou sa zistila prítomnosť piatich čítacích rámcov, označených *terB*, *terC*, *terD*, *terE* a *terF*. Disrupcia jednotlivých génov ukázala, že gén *terF*, na rozdiel od ostatných génov determinantu, nie je esenciálny z hľadiska zachovania teluričitanovej rezistencie. Použitím metódy umožňujúcej štúdium transkripcie (využitie fúzie *lacZ* génu na transkripčnej úrovni) sa zistila najnižšia hladina transkripcie u génu *terB*. Hladina transkripcie jednotlivých génov zostala nezmenená aj v prítomnosti teluričitanu draselného v médiu. Využitím ďalších konštruktov umožňujúcich štúdium expresie génov (na základe transkripčných a translačných fúzií) sa predpokladá objasnenie expresie determinantu.

#### LITERATÚRA

1. Burian J, Mačor M., Langšadl L., Beňo J., Guller L., Siekel P.: *Cesk. Epidemiol.* 37, 329 (1988).

### 23 ASYMMETRIC CELL DIVISION AND COMPARTMENT SPECIFIC GENE EXPRESSION DURING DIFFERENTIATION OF *BACILLUS SUBTILIS*

IMRICH BARÁK

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Sporulation in *Bacillus subtilis* has been extensively studied as a model of cellular differentiation. More than 100 genes are required for making a spore and most of these genes are activated sequentially during the sporulation process<sup>1,2</sup>. Differential gene expression occurs in the forespore and the mother cell because of sigma factors that are present in active form in only one cell type,  $\sigma^F$  followed by  $\sigma^G$  in the forespore,  $\sigma^E$  followed by  $\sigma^K$  in the mother cell<sup>3</sup>. Activation of  $\sigma^F$  in the forespore immediately after asymmetric division is the key event that ultimately defines the fate of both cells.

Phosphorylation of Spo0A protein is the key step in the regulation of sporulation initiation which is demonstrated morphologically by asymmetric septum formation and subsequently by differential activation of the first compartment specific sigma factors,  $\sigma^F$  and  $\sigma^E$ . Spo0A is phosphorylated by a phosphorelay, an extended version of a two-component signal transduction system<sup>4</sup>. Spo0A is a transcription activator as well as a transcription repressor. Spo0A is unique in that it stimulates transcription initiation by RNA polymerase containing different sigma – subunits. There is an evidence for the interaction of Spo0A with  $\sigma^A$  and  $\sigma^H$  (Ref.<sup>5</sup>). An alignment of Spo0A homologues from diverse *Bacillus* and *Clostridium* species revealed three highly conserved regions in the C-terminal domain<sup>6</sup>. The most highly conserved of these corresponds to the recognition helix of a putative helix-turn-helix motif, region II. It is not known what functions are associated with the two other regions (I and II). A missense mutation

*spo0A9V*, in the last conserved region of the C-terminal domain gives rise to a protein which is active as a repressor of *abrB* but which is unable to activate transcription of the *spoIIA* operon<sup>7</sup>. Intragenic suppressors of the *spo0A9V* mutation, *suv-4* and *suv-3*, have been identified in the first conserved region of the C-terminal domain. In contrast to the *spo0A9V* phenotype, where Spo0A is unable to activate transcription from the *spoIIA* promoter but is still functional in repressing *abrB*, our results show that the alteration S250H affects both the activating and repressing functions of Spo0A (Ref.<sup>8</sup>). Both these mutants are rescued by the same intragenic suppressor mutations, i.e. *suv-3* and *suv-4*, suggesting that conserved regions I and III of the effector domain of Spo0A should be in direct contact.

In order to understand fully the function of Spo0A, our laboratories are engaged in structural studies of this key regulator. We have succeeded in determining the structure of the phosphorylated form of the receiver domain<sup>9</sup>, in determining the structure of the non-phosphorylated form of the receiver domain<sup>10</sup>, in growing crystals of C-Spo0A (Ref.<sup>11</sup>) and only recently in solving the structure of C-Spo0A (Lewis R. J. et al., unpublished).

Sporulation in *B. subtilis* is initiated by an asymmetric division generating two cells of different size and fate. During a short interval the smaller forespore harbors only 30 % of the chromosome until the remaining part is translocated across the septum. We demonstrate that moving the gene for  $\sigma^F$ , the forespore-specific transcription factor, in the trapped region of the chromosome is sufficient to produce spores in the absence of the essential activators SpoIIAA and SpoIIIE. We propose that transient genetic asymmetry is the device which releases SpoIIIE phosphatase activity in the forespore and establishes cell specificity<sup>12</sup>.

The *B. subtilis* SpoIIIE protein appears to be constituted of 3 domains: a 330-residue N-terminal region containing 10 transmembrane segments and playing an important role in targeting SpoIIIE to the sporulation septum, a 276-residue central region poorly conserved and of no obvious function, and a 221-residue C-terminal region containing the PP2C domain acting on SpoIIAA-P (Ref.<sup>13-15</sup>). We proposed that an inhibitor of the SpoIIIE phosphatase is present in the predivisional cell, and that its inhibition is specifically released in the forespore. In our model genetic asymmetry is not created by unequal distribution of SpoIIIE within the sporangium, but by exclusion of the SpoIIIE inhibitor from the forespore.

*This work was supported by grant 5025 from the Slovak Academy of Sciences and The Wellcome Trust Collaborative Research Initiative Grant 056247/Z/98/Z.*

#### REFERENCES

1. Errington J.: *Microbiol. Rev.* 57, 1 (1993).
2. Stragier P., Losick R.: *Annu. Rev. Genet.* 30, 297 (1996).
3. Losick R., Stragier P.: *Nature* 355, 601 (1992).
4. Hoch J. A.: *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 441 (1993).
5. Baldus J. M., Buckner C. M., Moran Jr. C. P.: *Mol. Microbiol.* 17, 281 (1995).
6. Brown D. P., Ganova-Raeva L., Green B. D., Wilkinson S. R., Young M., Youngman P.: *Mol. Microbiol.* 14, 411 (1994).

7. Perego M., Wu J. J., Spiegelman G. B., Hoch J. A.: *Gene* 100, 207 (1991).
8. Schmeisser F., Brannigan J. A., Lewis R. J., Wilkinson A. J., Youngman P., Barák I.: *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 123 (2000).
9. Lewis R. J., Brannigan J. A., Muchová K., Barák I., Wilkinson A. J.: *J. Mol. Biol.* 294, 9 (1999).
10. Lewis R. J., Brannigan J. A., Muchová K., Leonard G., Barák I., Wilkinson A. J.: *J. Mol. Biol.* 297, 757 (2000).
11. Muchová K., Lewis R. J., Brannigan J. A., Offen W., Antson A. A., Brown D. P., Barák I., Youngman P., Wilkinson A. J.: *Acta Crystallogr. D* 55, 671 (1999).
12. Frandsen N., Barák I., Karmazyn-Campelli C., Stragier P.: *Genes Dev.* 13, 394 (1999).
13. Arigoni F., Guérou-Fleury A. M., Barák I., Stragier P.: *Mol. Microbiol.* 31, 1407 (1999).
14. Barák I., Behari J., Olmedo G., Guzmán P., Brown D. P., Castro E., Walker D., Westpheling J., Youngman P.: *Mol. Microbiol.* 19, 1047 (1996).
15. Barák I., Youngman P.: *J. Bacteriol.* 178, 4984 (1996).

## 24 CELL SPECIFICITY ESTABLISHMENT IN *BACILLUS SUBTILIS*

DUŠAN BLAŠKOVIČ and IMRICH BARÁK

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences,  
Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

*Bacillus subtilis* is rod shaped soil bacterium that usually divides by binary fission. The starvation signals that induce sporulation lead, at an early stage to asymmetric division event that creates a smaller cell, forespore, next to the larger mother cell. Prespore matures within cytosol of mother cell that uses up its resources to allow maturation of spore that can remain almost indefinitely after lysis of mother cell. Different gene expression occurs in the forespore and mother cell. Cell specificity is first established in the forespore under the control of  $\sigma^F$  factor, which itself is activated through the action of SpoIIE phosphatase, an enzyme targeted to the septum between the two cells. SpoIIE appears as the master regulatory protein establishing cell specificity during sporulation. The molecular mechanisms that restrict its action as a phosphatase to the forespore have been the subject of intense speculation. It is of critical importance for establishment of forespore specific gene expression that  $\sigma^F$  factor activation is prevented until after septation.

The requirement for some interaction taking place only in the septum and triggering SpoIIE activity would fill this goal. It was proposed that an inhibitor of the SpoIIE phosphatase is present in the pre-divisional cell and that its inhibition is specifically released in the forespore<sup>1</sup>. It was supposed hypothetical inhibitor can bind to central part of SpoIIE protein which contains conserved amino acids. To support this model we tend to find suppress mutation to *spoIIE48* mutation at central part of SpoIIE using *in vivo* mutagenesis. To make possible to find suppress mutation to *spoIIE48* we had to introduce additional mutation to *spoIIE48* to gain cells of *B. subtilis* unable to sporulate. To gain such cells we removed part of *spoIIE48* coding C-terminal part of SpoIIE. We expect-

ted that removal of that part of gene will prevent cells of *B. subtilis* to sporulate. We tested sporulation efficiency of strains with complete and truncated form of *spoIIE48* and found that truncated form of *spoIIE48* allows sporulation on the level only slightly decreased in comparison to complete *spoIIE48*. Although, the sporulation efficiency of strain with deletion in *spoIIE48* is low (less than 1 % of wild type strain), it is still high enough not to enable us to identify suppress mutations to *spoIIE48*. The way how to prevent sporulation of cells containing *spoIIE48* mutation is to introduce the next mutation into *spoIIE48*.

The next possible way how to elucidate the regulation of SpoIIE phosphatase activity and at once also characterise gene expression during onset of sporulation is to identify genes recognised by RNA polymerase at the onset of sporulation immediately after decision of cells of *B. subtilis* to sporulate. It is probable among identified genes will be present gene coding hypothetical inhibitor. To identify genes expressed during onset of sporulation, we propose to use two vector system in *E. coli*<sup>2</sup> and therefore we have to simulate sporulation conditions in *E. coli* by expression of Spo0A. Spo0A is a key regulatory protein of gene expression, during initiation of sporulation and belongs to large family of response regulators. The phosphorylated Spo0A can bind to sequences (called 0A boxes) and activate or repress the transcription of specific set of genes<sup>3</sup>. Spo0A regulates also the switch between vegetative and asymmetric sporulation septation. At the beginning of sporulation Spo0A interacts with  $\sigma^H$  factor (active after decision to sporulate) and RNA-polymerase of *B. subtilis* and activates transcription of particular genes recognised by  $\sigma^H$  factor. Despite a great deal is known about the regulation of gene expression during sporulation in *B. subtilis* we mean to assign genes expressed at the start of sporulation in presence of Spo0A.

To identify genes expressed at the beginning of sporulation we plan to use two compatible plasmid vector system in *E. coli*, where one plasmid contains  $\sigma^H$  factor coding gene of *B. subtilis* with part of *Spo0A* coding constitutively active C-terminal domain of Spo0A simulating sporulation in *E. coli*, and the other one contains a library of *B. subtilis* chromosomal DNA fragments containing potential promoters<sup>2</sup> cloned in front of promoterless  $\beta$ -galactosidase gene. After identification of promoters and particular genes recognised by RNA-polymerase in the presence of sigma factors and their common activator Spo0A it will be possible to determine to date unknown genes which are expressed during the switch from vegetative growth to sporulation in presence of Spo0A and to contribute to better understanding of processes running at the beginning of sporulation. To determine whether two vector system in *E. coli* is suitable for identification of genes recognized by  $\sigma^H$  factor we tested if Spo0A is able to interact with major  $\sigma^{70}$  factor and RNA-polymerase of *E. coli* which are homologous to sigma a factor and RNA-polymerase of *B. subtilis*. We proved this interaction by recognition of *spoIIE* promoter of *B. subtilis* by  $\sigma^{70}$  of *E. coli* in presence of Spo0A. This test imply two vector system is applicable for identification of genes recognised by  $\sigma^H$  factor in presence of Spo0A.

*This work was supported by grant 5025 from the Slovak Academy of Sciences and The Wellcome Trust Collaborative Research Initiative Grant 056247/Z/98/Z.*



## REFERENCES

1. Frandsen N., Barák I., Karmazyn-Campelli C., Stragier P.: *Genes Dev.* 13, 394 (1999).
2. Nováková R., Ševčíková B., Kormanec J.: *Gene* 208, 43 (1998).
3. Spiegelman G. B., Bird T. H., Voon V.: *Two-Component Signal Transduction* (Hoch J. A., Silhavy T. J., ed.). 1995.

## 25 DETECTION OF PROTEIN – PROTEIN INTERACTIONS OCCURRING DURING DIVISION PROCESSES IN *BACILLUS SUBTILIS*

ZUZANA CHROMIKOVÁ, PETER PREPIAK,  
and IMRICH BARÁK

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences,  
842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Sporulation in *Bacillus subtilis* as a special type of cell division represents an interesting model of cell differentiation. Each of two cells arisen, follows completely different program of gene expression, although both contain the same genetic information<sup>1</sup>. Methods of yeast two hybrid system that perform relatively simple approach for detection protein-protein interactions were used in elucidating of genetic schemes governing certain steps of the spore formation in *B. subtilis*.

There are two types of division recognised in some bacterial cells: *i*) a binary fission, occurring during vegetative growth and *ii*) asymmetric division, occurring during sporulation. Both types of division differ from each other in a septum thickness, structure and positioning<sup>2,3</sup>. In addition, sporulation division gives rise to two unequally sized progeny with different developmental potentials and fates. One of the cells – the smaller prespore becomes the spore, and the second one – the larger mother cell, participates in the maturation of the spore and finally lyses<sup>4,6</sup>. Despite all differences, sporulation division and vegetative division have some common features. It is likely, that mechanism of division proteins assembly is similar in both cases, since the aim of the division process is the same: to recognise and to identify one site of septation.

The division septum is created on a specific site of the cell. This process requires proper timing and must be topologically coordinated with other events regarding cell division, for example chromosome replication and nucleoid segregation<sup>4,7</sup>. Although the genome of *B. subtilis* is fully sequenced and the sporulation division had been studied for a couple of years, many of gene products taking part in this process remain without a characterised function.

The SpoIIE protein plays an important role in assuring of gene expression compartmentalisation, starting at the same time, or very soon after the septum completion. SpoIIE phosphatase activity occurring specifically in the forespore leads to activation of the forespore specific sigma factor  $\sigma^F$ , which promotes the transcription of forespore specific genes, not expressed in a mother cell<sup>1,8</sup>. It is still not known, how SpoIIE activity asymmetry is determined.

We have used a modified version of the yeast two hybrid vector system, allowing detection of protein–protein interaction of division proteins. The system was originally introduced for the identification of novel proteins from cDNA library interacting with a known “bait” protein, or for the identification of the interaction of two known proteins<sup>9,10</sup>. To make the system available for cloning of prokaryotic genomic DNA library, it was modified, so we obtained statistically relevant results. We have isolated many positive clones for protein–protein interaction of SpoIIE with proteins coded by the *B. subtilis* genomic library. These clones were analysed by DNA sequencing and examined, whether genomic library proteins are expressed in an appropriate time and at an appropriate place to the expression of SpoIIE.

Using yeast two hybrid system, an interaction between SpoIIE and SpoVAA was detected. SpoVAA is a sporulation protein synthesised much later than SpoIIE and at a time it is synthesised, the activity of SpoIIE is decreasing. Further experiments are aimed for detection of a protein interacting partner for SpoVAA, which could be a part of regulatory pathway. To account the influence of *spoVA* mutation on transcription governed by  $\sigma^F$  and  $\sigma^G$  factors, *lacZ* gene was placed under the control of  $\sigma^F$  and  $\sigma^G$  recognised sequences in *spoVA*<sup>–</sup> strains. These strains were further examined.

The second examined protein, DivIVA belongs to division proteins. *divIVA* mutation leads to minicell phenotype and cell division inhibition<sup>11–13</sup>. The proposition, that *divIVA* gene product has a big importance during vegetative growth division, namely in division site selection, is favoured by the fact, that it was found near the division septum<sup>7,8</sup>. It is still not known, whether DivIVA plays any role during sporulation process. A relevant biological interaction with any sporulation protein detected via yeast two hybrid system would be very helpful to account the role of DivIVA during sporulation.

*This work was supported by grant 5025 from the Slovak Academy of Sciences and The Wellcome Trust Collaborative Research Initiative Grant 056247/Z/98/Z.*

## REFERENCES

1. Levin P. A., Losick R.: *J. Bacteriol.* 176, 1451 (1994).
2. Arigoni F., Pogliano K., Webb C. D., Stragier P., Losick R.: *Science* 270, 637 (1995).
3. Barák I., Youngman P.: *J. Bacteriology* 178, 4984 (1996).
4. de Boer P. A. J., Cook W. R., Rothfield L. I., Lawrence I.: *Annu. Rev. Genet.* 24, 249 (1990).
5. de Boer P. A. J., Crossley R. E., Rothfield L. I.: *Cell* 56, 641 (1990).
6. de Boer P. A. J., Crossley R. E., Rothfield L. I.: *J. Bacteriol.* 174, 63, (1992).
7. Stragier P., Losick R.: *Annu. Rev. Genet.* 30, 297 (1996).
8. Arigoni F., Guérout-Fleury A.-M., Barák I., Stragier P.: *Mol. Microbiol.* 31, 1407 (1999).
9. Brent R., Ptashne M.: *Nature* 312, 612 (1994).
10. Brent R., Ptashne M.: *Cell* 43, 729 (1985).
11. Cha J. H., Stewart G. C.: *J. Bacteriol.* 179, 1671 (1997).
12. Edwards D. H., Errington J.: *Mol. Microbiol.* 24, 905 (1997).
13. Errington J.: *Microbiol. Rev.* 57, 1 (1993).

## 26 OVEREXPRESSION, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE DIVISION PROTEIN DivIVA

KATARINA MUCHOVÁ, EVA KUTEJOVÁ,  
and IMRICH BARÁK

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences,  
842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Cell division in *Bacillus subtilis* like in all rod-shaped bacteria is initiated by formation of a ring of the tubulin-like protein FtsZ. Nucleation of this “Z ring” seems to be a primary point of control over timing and positioning of the cell division septum. The “Z ring” is normally positioned precisely at the mid-cell, so the division gives rise to two equal daughter cells. Division sites selection is mediated by MinC and MinD proteins. These proteins are inhibitors of septation at medial and polar sites and their absence leads to minicell formation during vegetative growth. The DivIVA protein ensures that MinCD specifically inhibits division at the cell poles while allowing division at mid-cell during vegetative cell division<sup>1,2</sup>. Cha and Stewart (1997) proposed that on the other hand DivIVA is also involved in the activation of polar septation sites during sporulation<sup>2</sup>. It has been shown that at the onset of sporulation assembly of the FtsZ ring shifts from mid-cell to both polar sites. This switch is dependent on the transcription factor Spo0A (Ref.<sup>3</sup>). The FtsZ ring forms initially at both polar sites so MinCD inhibition of FtsZ assembly at both sites must be prevented early in the sporulation process<sup>4</sup>. It is proposed that an unknown sporulation factor interacts with DivIVA to make available the polar septation sites for the septation during sporulation. Why septation at one of the polar sites is subsequently inhibited is not known.

Localization of DivIVA to division sites is dependent on FtsZ and other cell division proteins (DivIB, DivIC, PbpB) (Ref.<sup>5</sup>). DivIVA is targeted to division sites late in their assembly and recruits MinD to the division sites to prevent another division from taking place near the newly formed cell poles. MinD is required both to pilot MinC to the cell poles and to constitute a functional division inhibitor. Sequestration of MinD and subsequently MinC to the cell poles releases the next mid-cell sites for division. Recent results show that the main role of DivIVA is to retain MinCD at the cell poles after the division is complete. After the division nears completion all components of division apparatus except DivIVA seem to disappear from this site. So in some point DivIVA must become attached to a more permanent anchor in the pole. This putative target DivIVA interacts with is still unknown<sup>6</sup>. Also the means by which *B. subtilis* switches from binary fission to asymmetric cell division during sporulation and the possible role of DivIVA in this process are still unravelled.

In order to better understand the action of the DivIVA protein it would be advantageous to solve its three dimensional structure by X ray crystallography. We cloned the *divIVA* gene into the expression vectors and purified the encoded protein. DivIVA was purified to homogeneity and analyzed by isoelectric focusing and analytical ultracentrifugation. The DivIVA is a 19.5 kDa cytoplasmatic protein with no significant sequence similarity to other sequences in the database. Our experiments with DivIVA showed that DivIVA forms multi-

mers *in vitro* and *in vivo*. Oligomerization of the MinE protein that is required for the proper placement of the cell division septum in *Escherichia coli* was recently observed<sup>7</sup>. Although both topological specificity factors, MinE of *E. coli* and DivIVA of *B. subtilis*, show no significant sequence similarity and act in a different way, it could be possible that assembly of a specific multimer of DivIVA plays an important role in the process of the septal placement during *B. subtilis* cell division.

*This work was supported by grant 5025 from the Slovak Academy of Sciences and The Wellcome Trust Collaborative Research Initiative Grant 056247/Z/98/Z.*

## REFERENCES

1. Edwards D. H., Errington J.: *Mol. Microbiol.* 24, 905 (1997).
2. Cha J.-H., Stewart G. C.: *J. Bacteriol.* 179, 1671 (1997).
3. Levin P., Losick R.: *Genes Dev.* 10, 794 (1996).
4. Barák I., Prepiak P., Schmeisser F.: *J. Bacteriol.* 180, 5327 (1998).
5. Marston A. L., Thomaidis H. B., Edwards D. H., Sharpe H. E., Errington J.: *Genes Dev.* 12, 3419 (1998).
6. Marston A. L., Errington J.: *Mol. Microbiol.* 33, 84 (1999).
7. Zhang Y., Rowland S., King G., Braswell E., Rothfield L.: *Mol. Microbiol.* 30, 265 (1998).

## 27 MUTATIONAL ANALYSIS OF THE N-TERMINAL PHOSPHO-ACCEPTOR DOMAIN OF Spo0A

KATARINA MUCHOVÁ<sup>a</sup>, R. J. LEWIS<sup>b</sup>,  
J. A. BRANNIGAN<sup>b</sup>, A. J. WILKINSON<sup>b</sup>,  
and IMRICH BARÁK<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences,  
842 51 Bratislava, Slovak Republic, <sup>b</sup>Department of Chemi-  
stry, University of York, Heslington, York, YO1 50D, UK*

Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by the phosphorylation of a response regulator Spo0A. Spo0A contains an N-terminal phospho-acceptor domain that shows sequence identity to other response regulators and a C-terminal DNA-binding domain that is unique. The N-terminal and C-terminal domains of Spo0A from *B. stearothermophilus* were successfully crystallized<sup>1</sup> and the three dimensional structures of both domains were solved recently<sup>2-4</sup>. Mutations in the phospho-acceptor domain have been prepared to study intramolecular contacts within a Spo0A dimer. After site-directed PCR mutagenesis several clones were obtained, subsequently sequenced and analyzed.

*B. subtilis* decides to sporulate by integrating a wide range of internal and external signals. The initiation of sporulation is primarily determined by the phosphorylation of a transcription factor Spo0A. Spo0A is phosphorylated by a phosphorelay, an extensive version of two-component signal transduction system<sup>5</sup>. The relay begins with the activation of one of three signal kinases. These kinases are activated by different input signals and also differ in their structural properties, cellular

localization and in their respective contribution to the sporulation process. In this cumulative envirosensory mechanism several kinases receiving different signals function to phosphorylate response regulator Spo0F. Spo0F serves as a phosphodonor for phosphotransferase Spo0B that finally transfers phosphate to the Spo0A. Once activated by phosphorylation, Spo0A regulates, in addition to its own expression and the phosphorelay loop, the transcription of at least seven genes required for the entry into sporulation<sup>5</sup>.

The central problem in understanding the function of response regulators is how does phosphorylation of the conserved aspartic acid residue in the phospho-acceptor domain activate the effector domain. As the C-terminal DNA-binding/transcriptional activator (repressor) domain alone is almost fully active, the phospho-acceptor domain is thought to inhibit the effector domain in the intact protein. Phosphorylation leads to conformational changes that overcomes this autoinhibition<sup>6</sup>.

Comparison of the structure of the phosphorylated N-Spo0A and the unphosphorylated forms of CheY and Spo0F shows the reorientation of the Thr84 side-chain that is accompanied by alterations of the conformation of Phe103 (Ref.<sup>2</sup>). There is further evidence for the important role of Thr84 and Phe 103 in signalling from the structure of unphosphorylated form of N-Spo0A (Ref.<sup>3</sup>). Comparison of these two N-Spo0A structures suggests that changes in the active site can be coupled to changes in quaternary structure (Lys106Pro107 trans/cis isomerization).

In order to define the surfaces used by Spo0A to mediate signal transduction from the N-terminal to the C-terminal domain site directed PCR mutagenesis was used. *B. subtilis* strains harbouring plasmids with mutated *spo0A* that showed changed sporulation phenotype were exposed to *in vivo* mutagenesis using EMS. Several clones containing suppress mutations were obtained, sequenced and further analyzed. The genes coding mutant Spo0A proteins were cloned into expression vectors, the encoded proteins were purified, analyzed by analytical ultracentrifugation and crystallized.

*This work was supported by grant 5025 from the Slovak Academy of Sciences and The Wellcome Trust Collaborative Research Initiative Grant 056247/Z/98/Z.*

## REFERENCES

1. Muchová K., Lewis R. J., Brannigan J. A., Offen W. A., Brown D. P., Barák I., Youngman P., Wilkinson A. J.: *Acta Crystallogr. D* 55, 671 (1999).
2. Lewis R. J., Brannigan J. A., Muchová K., Barák I., Wilkinson A. J.: *J. Mol. Biol.* 294, 9 (1999).
3. Lewis R. J., Muchová K., Brannigan J. A., Barák I., Leonard G., Wilkinson A. J.: *J. Mol. Biol.* 297, 757 (2000).
4. Lewis R. J., Krzywda S., Brannigan J. A., Turkenburg J. P., Dodson E. J., Muchová K., Barák I., Wilkinson A. J.: *Mol. Microbiol.* (submitted).
5. Perego M., Hoch J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1549 (1996).
6. Irreton K., Rudner D. Y., Siranosian K. J., Grossman A. D.: *Genes Dev.* 7, 283 (1993).

## 28 VIRULENCE FACTORS OF *COXIELLA BURNETII*

JANA MELNIČÁKOVÁ<sup>a</sup>, MARCO QUEVEDO DIAZ<sup>a</sup>,  
MAGDA LUKÁČOVÁ<sup>a</sup>, JÁN KORMANEC<sup>b</sup>,  
and IMRICH BARÁK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Virology, Department of Rickettsiae, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 45 Bratislava,*

<sup>b</sup>*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

*Coxiella burnetii*, the etiologic agent of Q fever is unique among the rickettsiae in that it undergoes a transition from virulent (phase I) to avirulent (phase II). This phase transition correlates with some of biological characteristics of the smooth – to – rough lipopolysaccharide (LPS) variation of gram – negative *Enterobacteriaceae*. The virulent phase I *C. burnetii*, isolated from natural infections, has a more complex smooth – type LPS. Typically, LPS consists of a complex polysaccharide chain covalently linked to glucosamine lipid (lipid A) via two molecules of 3-deoxy-D-manno-octulosonate (Kdo). Kdo is synthesised and covalently linked to lipid a by the following reactions (catalytic enzymes are in parentheses): *i*) D-arabino-5-phosphate + phosphoenolpyruate → Kdo-8-phosphate (Kdo phosphate synthetase), *ii*) Kdo-8-phosphate → Kdo and P<sub>i</sub> (Kdo-8-phosphate phosphatase), *iii*) Kdo + CTP → CMP-Kdo + P<sub>ii</sub> (CMP-Kdo synthetase), and *iv*) CMP-Kdo + lipid a precursor → CMP + lipid a precursor-Kdo (Kdo transferase). The last reaction occurs twice, resulting in lipid A-Kdo disaccharide<sup>1</sup>. The avirulent phase II *C. burnetii*, selected during serial laboratory passage in immunologically incompetent host such as eggs or tissue culture, contains a rough – type LPS. Phase II cells lost ability to polymerise saccharide O – chain characteristic for phase I LPS. One of the most important virulence factor of *C. burnetii* is just LPS phase I.

Our laboratories are approaching this phenomenon from two directions. Firstly, we are interested to clone *kdtA* gene encoding the enzyme 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) transferase of lipopolysaccharide biosynthesis. Secondly, we are searching for genes responsible for pathogenicity of *C. burnetii*, namely for specific sigma factors which are important for their transcription.

Kdo is absolutely essential for the survival of the bacterium and therefore it is a target for new types of antibiotics<sup>2,4</sup>. We have already designed DNA oligonucleotide probes for PCR of *kdtA* gene encoding Kdo transferase based on comparison of the amino sequences of the *kdtA* genes of *Escherichia coli* K-12, *Chlamydia trachomatis* serotype L2, *Chlamydia psittaci* strain 6BC, *Chlamydia pneumoniae* strain TW-183 (Ref.<sup>4</sup>).

Our search for *C. burnetii* sigma factors lead us to clone the genes coding possible such transcription factors. We used the oligonucleotide probes to clone homologous genes of stress specific  $\sigma$  factors, which are believed to be important for pathogenicity. The PCR reaction gave us clear DNA band of right size (500 bp) which should respond to such  $\sigma$  factor's gene from *C. burnetii*. We probed this fragment by Southern blotting to make sure, that this potential  $\sigma$  factor's gene originates from *C. burnetii* chromosomal DNA. The cloning and further characterisation of this fragment is in progress.

*C. burnetii* is an obligate parasite and thus the molecular



biology methods for this microorganism are poorly developed. Although, we just recently described the new method of transformation of this bacterium<sup>5</sup>, a method for transformation of statistical library back to this microorganism would be helpful. For this purpose we used plasmid pKK-GFP with fragment from *C. burneti* to characterise the homologous recombination in this bacteria. The recombination events were determined by Southern hybridisation.

*This work was supported by grant 7057 and 5025 from the Slovak Academy of Sciences and The Wellcome Trust Collaborative Research Initiative Grant 056247/Z/98/Z.*

## REFERENCES

1. Wylie J. L., Iliffe E. R., Wang L. L., McClarty G.: *Infect. Immun.* 65, 1527 (1997).
2. Goldman R., Kohlbrenner W., Lartey P., Rernet A.: *Nature* 329, 162 (1987).
3. Hammond S. M., Claesson A., Jansson A. M., Larsson L.-G., Pring B. G., Town C. M., Ekström B.: *Nature* 327, 730 (1987).
4. Löbau S., Mamat U., Brabetz W., Brade H.: *Mol. Microbiol.* 18, 391 (1995).
5. Lukáčová M., Valková D., Diaz M. Q., Perečko D., Barák I.: *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 255 (1999).

## 29 EXTRAGENOMIC DOUBLE-STRANDED DNA CIRCLES: NOVEL PLAYERS IN THE MITOCHONDRIAL TELOMERE MAINTENANCE?

JOZEF NOSEK<sup>a</sup> and LUBOMÍR TOMÁŠKA<sup>b</sup>

*Departments of <sup>a</sup>Biochemistry and <sup>b</sup>Genetics, Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina <sup>a</sup>CH-1 and <sup>b</sup>B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia*

Although a typical mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular molecule, there is a large number of organisms containing linear mitochondrial genomes possessing a homogeneous terminal structure. Currently, there are at least six distinct classes of linear mitochondrial genophores based on the structure of their telomeres<sup>1</sup>. The type of mitochondrial telomeres identified in three yeast species, *Candida parapsilosis*, *Pichia philodendra* and *C. salmanticensis*, is characterized by the inverted terminal repeats each consisting of several tandemly repeated units. In *C. parapsilosis*, the molecules terminate at a defined position within a repetitive unit, thus generating a 5' single-stranded extension. However, the molecular mechanisms of replication, stabilization and maintenance of this type of mitochondrial telomeres are not known<sup>2,3</sup>.

In course of the study of replication of linear mitochondrial DNA of *C. parapsilosis* by two-dimensional neutral/neutral agarose gel electrophoresis we observed a presence of distinct DNA fragments composed solely of mitochondrial telomeric sequences. The behavior of these fragments under the employed conditions suggested that they are of circular nature. The minicircles were purified from mitochondria of *C. parapsilosis* by an alkaline lysis method and inspected by electron

microscopy. The electron-microscopic analysis revealed a presence of highly supertwisted circular molecules that were relaxed by a treatment with pancreatic DNase I. Measurement of the lengths of minicircles revealed that (based on their sizes) the minicircles fall into distinct categories. The lengths of the minicircles corresponded to  $n \times 738$  bp ( $n = 1-7$ ). Similar results were obtained, when two other yeast species (*P. philodendra* and *C. salmanticensis*) possessing the similar type of mitochondrial telomeres were examined, suggesting that the presence of mitochondrial telomeric minicircles is not limited to *C. parapsilosis*<sup>4</sup>, a potential mechanism of the generation of minicircles and their role in the replication of linear mtDNA is discussed.

*This work was supported by grants from Slovak grant agency VEGA (1/6168/99 and 1/7248/00), Howard Hughes Medical Institute Grant (75195-547301) and International research grant program of Universidad de Complutense Madrid, Spain.*

## REFERENCES

1. Nosek J., Tomáška L., Fukuhara H., Suyama Y., Kováč L.: *Trends Genet.* 14, 183 (1998).
2. Nosek J., Dinouel N., Kováč L., Fukuhara H.: *Mol. Gen. Genet.* 247, 61 (1995).
3. Nosek J., Tomáška L., Pagáčová B., Fukuhara H.: *J. Biol. Chem.* 274, 8850 (1999).
4. Tomáška L., Nosek J., Makhov A., Pastoráková A., Grifit J. D.: submitted.

## 30 MITOCHONDRIAL TELOMERE-BINDING PROTEIN OF CANDIDA PARAPSILOSIS: TINKERING STRATEGY OF THE EVOLUTION OF LINEAR MITOCHONDRIAL GENOMES

LUBOMÍR TOMÁŠKA<sup>a</sup>, BLANKA KUČEJOVÁ<sup>b</sup>, and JOZEF NOSEK<sup>b</sup>

*Departments of <sup>a</sup>Genetics and <sup>b</sup>Biochemistry, Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina <sup>a</sup>B-1 and <sup>b</sup>CH-1, 842 15 Bratislava, Slovakia*

The study of linear mitochondrial genomes evokes several questions with regard to the evolutionary origin of linear and circular mitochondrial DNAs. Several lines of evidence suggest that the conversion from one form to another occurred accidentally through a relatively simple mechanism. Thus the cell with linearized mitochondrial genome may have employed a tinkering strategy of dealing with the end-replication problem and mobilize a pre-existing set of proteins to ensure its replication<sup>1</sup>.

Previously we have reported the identification of the first mitochondrial telomere-binding protein (mtTBP) that specifically binds a sequence derived from the extreme end of *C. parapsilosis* linear mtDNA (Ref.<sup>2,3</sup>). Sequence analysis of the corresponding nuclear gene *MTP1* revealed that mtTBP shares homology with several bacterial and mitochondrial single-stranded DNA-binding (SSB) proteins<sup>4</sup>. In this study, DNA binding properties of mtTBP *in vitro* and *in vivo* were analyzed by electron microscopy. When the M13 single-stranded DNA



was used as a substrate, mtTBP exhibited similar DNA binding characteristics as human mitochondrial SSB. MtTBP formed protein globules along the DNA substrate. The bound proteins were randomly distributed indicating that the binding of mtTBP to M13 single-stranded DNA is not highly cooperative. Negatively stained samples revealed the presence of a thin mtTBP filament between the individual protein globules suggesting the presence of a twisted DNA at sites of the protein globules.

The electron-microscopic analysis demonstrated that mtTBP is able to recognize the 5' single-stranded telomeric overhangs in their natural context. Furthermore, using an isopycnic centrifugation of mitochondrial lysate of *C. parapsilosis* we show that mtTBP is a structural part of mitochondrial nucleoids of *C. parapsilosis* predominantly bound to the mitochondrial telomeres. These data support a dual role of mtTBP in mitochondria of *C. parapsilosis*, serving both as a typical mitochondrial SSB and as a specific component of the mitochondrial telomeric chromatin.

*This work was supported by grants from Slovak grant agency VEGA (1/6168/99 and 1/7248/00), Howard Hughes Medical Institute Grant (75195-547301) and International research grant program of Universidad de Complutense Madrid, Spain.*

#### REFERENCES

1. Nosek J., Tomáška L., Fukuhara H., Suyama Y., Kováč L.: Trends Genet. 14, 183 (1998).
2. Tomáška L., Nosek J., Fukuhara H.: J. Biol. Chem. 272, 3049 (1997).
3. Tomáška L.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 457 (1998).
4. Nosek J., Tomáška L., Pagáčová B., Fukuhara H.: J. Biol. Chem. 274, 8850 (1999).

### 31 NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE IN YARROWIA LIPOLYTICA: MOLECULAR ANALYSIS OF THE GENE CODING FOR THE 51 kDa SUBUNIT

ADRIANA RYČOVSKÁ

*Department of Biochemistry, Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovakia*

Many biological phenomena including the process of energy conversion in mitochondria can be analyzed by employing the yeasts and their biochemical mutants<sup>1</sup>. This prompted us to prepare the yeast model of the respiratory complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase). This enzymatic complex catalyzes the oxidation of NADH by ubiquinone in the reaction coupled to proton transfer across the mitochondrial membrane. It consists of at least 41 subunits that are encoded by two different genetic systems, mitochondrial and nuclear genome<sup>2,3</sup>. Although baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not possess the phosphorylation coupling site I and consequently it is not suitable for the study of complex I, several investigations revealed the presence of respiratory complex I in a wide range of non-conventional yeasts<sup>4,5</sup>. One of these

species, the obligately aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* due to well elaborated genetic tools<sup>6</sup> seems to be an organism of choice for molecular analysis of the mitochondrial complex I.

Recently, we have cloned a nuclear gene *NUO51* coding for a homologue of the nucleotide-binding subunit of mitochondrial respiratory chain linked NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Y. lipolytica*<sup>7</sup>. DNA sequencing revealed the open reading frame coding for a protein with predicted molecular mass of about 53.7 kDa. The sequence is highly conserved with its counterparts from filamentous fungi and represents the first yeast homologue of the NADH-binding subunit (51 kDa) of the respiratory complex I. The *NUO51* is a single copy gene that is localized on a 3.5 Mbp chromosome band of electrophoretic karyotype. The role of its expression in the biogenesis of complex I and different cellular processes are discussed.

*This work was supported by grants from Comenius University, Slovak grant agency VEGA (1/7248/00), Howard Hughes Medical Institute Grant (75195-547301) and International research grant program of Universidad de Complutense Madrid, Spain.*

#### REFERENCES

1. Kováč L.: Biochim. Biophys. Acta. 346, 101 (1974).
2. Ohnishi T.: J. Bioener. Biomembr. 25, 325 (1993).
3. Friedrich T., Steinmüller K., Weiss H.: FEBS Lett. 367, 107 (1995).
4. Nosek J., Fukuhara H.: J. Bacteriol. 176, 5622 (1994).
5. Büschges R., Bahrenberg G., Zimmermann M., Wolf K.: Yeast 10, 475 (1994).
6. Barth G., Gaillardin C.: FEMS Microbiol. Rev. 19, 219 (1996).
7. Ryčovská A., Szabo R., Tomáška L., Nosek J.: submitted.

### 32 PRÍPRAVA TRANSFORMAČNÉHO SYSTÉMU KVASINKY CANDIDA PARAPSILOSIS

JÚLIA ZEMANOVÁ

*Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Mitochondriálne genómy kvasiniek slúžia ako jednoduché modely na skúmanie rôznych aspektov evolúcie a organizácie eukaryotických genómov. u potenciálne patogénnej kvasinky *Candida parapsilosis*, bola identifikovaná lineárna mitochondriálna DNA (mtDNA) (cit.<sup>1</sup>). Spôsob akým sa táto DNA replikuje zatiaľ nie je známy. Svetlo do tejto problematiky by mohla priniesť identifikácia a charakterizácia proteínov *C. parapsilosis* schopných interagovať s mitochondriálnymi telomérmi.

Prednedávnom bol identifikovaný a purifikovaný proteín (mtTBP), ktorý sa špecificky viaže na sekvenciu jednovláknových koncov mtDNA *C. parapsilosis*<sup>2</sup>. Jeho štúdium by mohlo priniesť odpovede na mnohé otázky týkajúce sa mtDNA *C. parapsilosis*, a zároveň prispieť k objasneniu evolučných počiatkov lineárnych mitochondriálnych genómov. *In vivo* analýza je však skomplikovaná neexistenciou transformačného systému, ktorého príprave je venovaná prezentovaná práca.

Príprava transformačného systému pre mikroorganizmy zahŕňa: *i*) výber vhodného selekčného markera, prípadne prípravu hostiteľských kmeňov s nerevertujúcimi mutáciami v génoch, kódujúcich enzýmy rôznych metabolických dráh, ktoré môžu byť komplementované transformáciou, *ii*) prípravu vektora nesúceho klonovanú sekvenciu, ktorá bude komplementovať daný marker, *iii*) výber a optimalizáciu vhodnej metódy na vnesenie DNA do hostiteľskej bunky, *iv*) zabezpečenie stabilného udržania a replikácie tejto DNA a *v*) zabezpečenie expície génov prítomných na vektorovej DNA (cit.<sup>3</sup>).

Chemickou mutagenezou sa nám podarilo pripraviť niekoľko auxotrofných mutantov – *gal<sup>-</sup>* a *me<sup>-</sup>*, *his<sup>-</sup>*, *arg<sup>-</sup>*, *thr<sup>-</sup>*. Gén *CpGAL1* komplementujúci mutáciu v géne pre galaktokinázu, bol identifikovaný a použitý na konštrukciu vektorov. Transformáciu *C. parapsilosis* týmito vektormi sme robili lítium-acetátovou metódou<sup>4</sup>, avšak transformačné účinnosti boli veľmi nízke. Optimalizáciou jednotlivých krokov tejto metódy sa nám účinnosť podarilo zvýšiť na viac ako 10<sup>3</sup> transformantov/μg plazmidovej DNA. Ďalšie zefektívnenie je možné dosiahnuť aj identifikáciou *ARS* sekvencie *C. parapsilosis*.

Pripravený transformačný systém bude možné využiť na štúdium *in vivo* expície mtTBP, prípadne iných proteínov interagujúcich s mitochondriálnymi telomérmi *C. parapsilosis* a sledovania ich fyziologickej úlohy pri udržiavaní mitochondriálnych telomér. Štúdium týchto procesov a ich regulácie by mohlo prispieť k objasneniu mechanizmu replikácie lineárnych mitochondriálnych genómov a ich evolučného pôvodu.

Táto práca bola podporená grantami VEGA (1/6168/99), Howard Hughes Medical Institute Grant (75195-547301), International research grant program of Universidad de Complutense Madrid, Spain a grantom Univerzity Komenského.

#### LITERATÚRA

1. Kováč L., Lazowska J., Slonimski P. P.: Mol. Gen. Genet. 197, 420 (1984).
2. Tomáška L., Nosek J., Fukuhara H.: J. Biol. Chem. 272, 3049 (1997).
3. Kwon Chung K. J., Goldman W. E., Klein B., Szeniszlo P. J.: Med. Mycol. 36, 38 (1998).
4. Gietz R. D., Schiestl R. H.: Methods Mol. Cell. Biol. 5, 255 (1995).

#### 33 ŽIVOTASCHOPNOSŤ BUNIEK KVASINIEK A ŠTRUKTÚRA MITOCHONDRIÁLNYCH MEMBRÁN

YVETTA GBELSKÁ, MARGITA OBERNAUEROVÁ  
a JÚLIUS ŠUBÍK

Katedra mikrobiológie a virológie PRIF UK, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Životaschopnosť *petite*-negatívnych kvasiniek závisí od intaktnosti mitochondriálneho genómu, ktorý kóduje niektoré zložky proteosyntetického systému a oxidačnej fosforylácie mitochondrií. Z *petite*-negatívneho druhu kvasiniek *Kluyveromyces lactis*, sa po mutagenéze etylmetansulfonátom izo-

lovalo niekoľko jadrových mutantov s poruchou v mitochondriálnych funkciách<sup>1</sup>. Tieto mutanty nerástli na neskvasiteľných zdrojoch uhlíka a energie, mali nízku respiračnú aktivitu a neprežívali mutagenézu s etídiumbromidom. Komplementáciou mutantného fenotypu sa z genómovej banky *K. lactis* izolovali tri gény: gén špecifikujúci apocytochóm c, apocytochóm c<sub>1</sub> a gén kódujúci proteín zúčastňujúci sa biogenézy funkčnej cytochromoxidázy. Životaschopnosť *petite*-pozitívnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sa stáva závislou od intaktnosti mitochondriálneho genómu v prípade ak sa mutáciou génu *PEL1* (cit.<sup>2,3</sup>) inaktivuje fosfatidylglycerofosfátsyntetáza. Použitím fúzných génov *PEL1-GFP* a *PEL1-lacZ* sa dokázala lokalizácia Pel1p v mitochondriách. Expresia génu *PEL1* bola reprimovaná prítomnosťou inozitolu a cholínu v kultivačnom médiu. Mutant *pell* s poruchou v syntéze fosfatidylglycerolu a kardiopínu po mutagenéze s etídiumbromidom nerástol na komplexných médiach s glukózou. Na druhej strane rýchlosť rastu dvojitého mutantu *crd1rho<sup>-</sup>* bola za rovnakých podmienok porovnateľná s mutantom *crd1*, ktorý v dôsledku defektu v syntéze kardiopínu hromadil fosfatidylglycerol. Získané výsledky dokumentujú, že *petite*-negativita kvasiniek nesúvisí s inaktíváciou respiračného reťazca ani so schopnosťou tvoriť ATP oxidačnou fosforyláciou. Pre zabezpečenie špecifických funkcií mitochondrií, ktoré sú nepostradateľné pre normálny miotický rast buniek kvasiniek v neprítomnosti intaktného mitochondriálneho genómu, prítomnosť negatívne nabitých fosfolipidov fosfatidylglycerolu a kardiopínu je esenciálna.

Táto práca bola podporená grantami VEGA, MŠ SR a Howard Hughes Medical Institute, USA.

#### LITERATÚRA

1. Gbelská Y., Horváthová K., van der Aart Q. J. M., Zonnenveld B. J. M., Steensma H. Y., Šubík J.: Curr. Genet. 31, 145 (1996).
2. Janitor M., Šubík J.: Curr. Genet. 24, 307 (1993).
3. Janitor M., Obenauerová M., Kohlwein S. D., Šubík J.: FEMS Microbiol. Lett. 140, 43 (1996).

#### 34 MNOHONÁSOBNÁ REZISTENCIA U KVASINIEK SACCHAROMYCES CEREVISIAE MÔŽE BYŤ VYVOLANÁ SUBSTITÚCIAMI AMINOKYSELÍN V ŠPECIFICKÝCH DOMÉNACH TRANSKRIPČNÉHO AKTIVÁTORA Pdr3p

ZUZANA KOZOVSKÁ<sup>a</sup>, TIBOR SIMONICS<sup>a</sup>,  
DANIELA PAPAJOVÁ<sup>a</sup>, AMINE NOURANI<sup>b</sup>,  
AGNES DELAHODDE<sup>b</sup>, CLAUDE JACQ<sup>b</sup>  
a JÚLIUS ŠUBÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, <sup>b</sup>Laboratoire de Genetique Moleculaire, Ecole Normale Supérieure, 75230 Paris Cedex 05, France

Gén *PDR3*, identifikovaný prostredníctvom mutácie vyvolávajúcej u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* rezistenciu proti antibiotiku mucidínu a iným antifungálnym látkam<sup>1,2</sup>,

špecifikuje transkripčný faktor, ktorý pozostáva z 976 aminokyselín a obsahuje DNA viažuci motív zinkového prstu<sup>3</sup>. Spolu s produktom homologického génu *PDR1* sa podieľa na regulácii expresie siete génov *PDR*, ktorých hyperexpresia spôsobuje rezistenciu kvasiniek proti početným štruktúrne a funkčne odlišným cytotoxickým látkam.

S cieľom prispieť k objasneniu molekulárnych mechanizmov mnohonásobnej rezistencie u kvasiniek podrobili sme gén *PDR3* mutačnej analýze. *In vitro* mutagenézou s hydroxylamínom sme pripravili sériu mutantov *pdr3*, ktoré niesli bodové mutácie v rôznych oblastiach génu *PDR3*. Väčšina z identifikovaných mutácií spôsobila substitúcie aminokyselín, ktoré sa mapovali do centrálnej a C-terminálnej oblasti *Pdr3p*. Všetky analyzované mutácie boli semidominantné a vyvolávali rezistenciu kvasiniek proti cykloheximidu, sulfometuronmetylu, 4-nitrochinolín-*N*-oxidu, flukonazolu, mucidínu, chloramfenikolu a oligomycínu. V transaktivačných experimentoch mutantné alely *pdr3* spôsobovali hyperexpresiu reportérového génu *lacZ*, ktorého expresia bola pod kontrolou splynutého promótoru génov *PDR3*, *PDR5* alebo *SNQ2*. Hyperexpresia génov *PDR5* a *SNQ2*, ktoré špecifikujú dve efluxné pumpy typu ABC transportérov, sa potvrdila aj Western blot analýzou bunkových extraktov mutantov *pdr3* s využitím protilátok proti *Pdr5p* a *Snq2p*. Získané výsledky demonštrujú, že mnohonásobná rezistencia u kvasiniek môže vzniknúť v dôsledku zvýšeného transkripčného potenciálu mutácie zmenených molekúl transkripčného aktivátora *Pdr3p*. Odpovedajúce substitúcie aminokyselín vyvolávajúce mnohonásobnú rezistenciu boli identifikované v sekvenčných motívoch evolučne konzervovanej centrálnej regulačnej domény a v C-terminálnej aktivačnej doméne *Pdr3p*. Tieto motívy hrajú pravdepodobne významnú úlohu v kontrole interakcií typu DNA-proteín, resp. proteín–proteín v priebehu aktivácie transkripcie génov transportných systémov cytoplazmatickej membrány kvasiniek. Ich hyperexpresia v dôsledku mutácií *pdr3* spôsobuje zvýšený eflux početných metabolických inhibítorov z bunky a navodzuje fenotyp mnohonásobnej rezistencie, ktorý u patogénnych kvasiniek nežiadúco ovplyvňuje liečbu mykóz.

*Táto práca bola podporená grantami VEGA, MŠ SR a Howard Hughes Medical Institute, USA.*

#### LITERATÚRA

1. Šubík J., Kováčová V., Takáčsová G.: Eur. J. Biochem. 73, 275 (1977).
2. Šubík J., Ulaszewski S., Goffeau A.: Curr. Genet. 10, 665 (1986).
3. Delaveau T., Delahodde A., Carvajal E., Šubík J., Jacq C.: Mol. Gen. Genet. 244, 501 (1995).

#### 35 EXPRESSION OF THE *yodA* GENE INDUCED UNDER CADMIUM STRESS IN *ESCHERICHIA COLI*

ANDREA PUŠKÁROVÁ and PETER FERIANC

*Institute of Microbiology of Slovak Academy of Sciences, Štefánikova 3, 814 34 Bratislava, Slovak Republic*

Cadmium, a toxic heavy metal with not known biological activity, has detrimental effects on the growth and metabolism

of microorganisms, plants, and animals. A new 24.8 kDa protein *YodA* was found in *Escherichia coli* during cadmium stress. It was firstly identified as protein designated F023.3 (Ref.<sup>1</sup>). Based on its N-terminal amino acid sequence degenerated oligonucleotide probe was prepared and by following hybridization its open reading frame (o216) was identified, which was located at about 44 min on the *E. coli* K-12 chromosome. The *YodA* has been identified as the product of o216 in the sequencing of the *E. coli* genome which predicted o216 to contain a gene designated “b1973” (Ref.<sup>2</sup>). The sequence of a potential gene encoding a 216-amino acid protein (*YodA*, SwissProt accession no. P76344) is identical to that of previously identified, thus we have adopted the gene name, *yodA*. In this report we describe the inductibility of *yodA* gene on the chromosome by cadmium.  $P_{yodA}$ -*lacZ* transcriptional gene fusion was constructed. In addition, we demonstrate the effect of mutations in *soxS*, *oxyR* and *fur* on the induction of *yodA* by cadmium.

Work with a monolysogen operon fusion showed that *yodA* gene was expressed at a very low level during log-phase growth and no induction was observed in stationary phase. Next we investigated the effect of  $CdCl_2$  on the expression of the  $P_{yodA}$ -*lacZ* fusion. When exponentially growing cells were challenged with  $CdCl_2$  (25 mg.l<sup>-1</sup>) the level of  $P_{yodA}$ -*lacZ* expression was increased dramatically (greater than 50 fold). Many of the *oxyR* regulon proteins are induced during the initial hour of exposure to  $CdCl_2$  (Ref.<sup>1</sup>). Thus we examined also the effect of  $H_2O_2$  on *yodA* expression. Addition of  $H_2O_2$  (2 mmol.l<sup>-1</sup>) did not increase the level of *yodA* expression significantly. However, if the concentration was raised to 10 mmol.l<sup>-1</sup> there was a 50-fold increase in the expression of *yodA*. We suggested, that cadmium treatment may lead to the generation of the same oxidative stress-inducing signals as were elicited by  $H_2O_2$  and that *yodA* may be under the control of *oxyR* regulon. To examine this question, mutation in the *oxyR* regulator was introduced into the  $P_{yodA}$ -*lacZ* fusion strain. However, the induction of *yodA* by  $CdCl_2$  was *oxyR* independent. The result suggests that other regulator must operate to control the expression of *yodA* by  $CdCl_2$ . To investigate this possibility further, we determined the effect of mutations in *soxS* and *fur*, known regulators of several stress promoters in *E. coli*, on *yodA* expression. The *soxS* and also *fur* mutant did not show the elevated level of *yodA* induction. Induction was very reduced but not completely. We conclude that induction of *yodA* by cadmium was dependent of *soxS* and *fur*, but independent of *oxyR*.

*This work was supported by VEGA Grant No. 2/5099/98.*

#### REFERENCES

1. Ferianc P., Farewell A., Nyström T.: Microbiology 144, 1045 (1998).
2. Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y.: Science 277, 1453 (1997).



### 36 ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS USING DNA MICROARRAY TECHNOLOGY

LENKA ONDROVÁ<sup>a</sup>, MARKÉTA ČERVENKOVÁ<sup>a</sup>,  
VRATISLAV ŠULC<sup>b</sup>, JOSEF ZICHA<sup>b</sup>,  
JOSEF HOUŠTĚK<sup>c</sup>, MARTIN HŘEBÍČEK<sup>a,d</sup>,  
and STANISLAV KMOCH<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Institute for Inherited Metabolic Disorders 1. LF UK, Ke Karlovu 2, 120 00 Prague 2, <sup>b</sup>Division of Precision Mechanics and Optics, CTU, Horská 4, 128 03 Prague 2, <sup>c</sup>Physiological Institute, ASCR, Vídeňská 1083, 142 00 Prague 4, <sup>d</sup>GeneAge Technologies, a.s., Pod kaštany 3/5, 160 00 Prague 6, Czech Republic

The DNA microarray technology appears to be one of the most promising and dynamically evolving approaches fulfilling all requirements of functional genomics and high throughput DNA diagnostics.

The method (which can be seen as a miniaturised version of classic dot-blot analysis) is based on detection and analysis of hybridisation events of tested nucleic acids with an array of single stranded DNA fragments (PCR products, oligonucleotides) immobilised on solid surface. Recent advances in robotics, immobilisation chemistries, sensitivity of DNA labelling, fluorescence detection systems and bioinformatics 1) make technique amenable to miniaturisation and automation, so thousands of various nucleic acid sequences can be analysed in a single experiment and 2) make technology approachable by academic research.

We have successfully set up DNA microarray technology platform consisting of preparation and characterisation of cDNA libraries, preparation of amino-modified DNA probes (PCR products, oligonucleotides), arraying and immobilisation of probes at various densities (up to 4900 probes/cm<sup>2</sup>; GeneSurfer arrayer, GeneAge Technologies), on poly-*N*-lysine or epoxysilane modified microscope slides. The hybridisation of fluorescently labeled DNAs is monitored using laser microarray scanner GeneTac IVL (Genomic Solutions).

Current pilot experiments are focused on detection of 19 glucocerebrosidase gene mutations encompassing whole mutational spectrum of Czech Gaucher patients<sup>1</sup> and on expression of 16 ATPase subunits under normal and pathological states in different tissues and *in vitro* cellular models (mitochondrial disorders).

*This work is supported by grants NM/5888-2 IGA MZČR, 301/99/M023 GAČR, VS96/127 and VZ111100003 MŠMT, 88/1999/C GAUK.*

#### REFERENCES

1. Hodanova K., Hrebicek M., Cervenkova M., Mrazova L., Veprekova L., Zeman J.: *Blood Cells Mol. Dis.* 25, 287 (1999).

### 37 A STUDY OF THE $\beta$ -GLUCOCEREBROSIDASE GENE MUTATIONS: VACCINIA EXPRESSION SYSTEM

KATEŘINA HODAŇOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN HŘEBÍČEK<sup>a</sup>,  
and ZORA MĚLKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Inherited metabolic Disorders, Div. B, <sup>b</sup>Institute of Pathological Physiology, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Gaucher disease is the most frequent sphingolipidosis. It is caused by lysosomal  $\beta$ -glucocerebrosidase (GCD) deficiency or rarely by the deficiency of sphingolipid activator protein, saposin C. More than 120 mutations were described in the human  $\beta$ -glucocerebrosidase gene in Gaucher patients<sup>1</sup>. The majority of GCD deficient Gaucher patients are compound heterozygotes. In non-Jewish populations rare or private mutations form about 25–30 % of mutant alleles<sup>2</sup>. Therefore, functional expression of mutant GCD is necessary to distinguish neutral mutations from deleterious mutations.

We have used hybrid vaccinia expression system to study wild-type and mutant GCD. We have expressed novel and rare mutations found in Czech Gaucher patients<sup>3</sup>. The individual mutations were introduced by site-directed mutagenesis into expression vector pTM1-glu1, which contains human GCD cDNA under control of T7 promoter<sup>4,5</sup>. After transfection of BSC40 cell line infected with WT vaccinia virus, recombinant vaccinia viruses were selected in 143TK(–) cell line in the presence of bromodeoxyuridine<sup>6</sup>.

We have constructed five recombinant vaccinia viruses carrying wild-type and mutant human GCDs. The BSC40 cell line was co-infected with VTF7-3 vaccinia virus, which expresses T7 RNA polymerase, and with each of the recombinant viruses. High levels of GCD expression were achieved – the background activity of the cell line used was always less than 4 % of total  $\beta$ -glucosidase activity. Mutant GCDs (1263del60, 1326insT, 72delC, S196P) had significantly reduced  $\beta$ -glucosidase activity – 5 % or less of wild-type GCD. The GCD carrying mutation S196P had repeatedly higher (average 5 %) activity than GCD carrying null mutations (average of wild-type GCD 1 % activity). The amount of immunoreactive material as expressed in S196P was comparable to wild-type GCD, while in non-sense mutations the amount of immunoreactive material was severely reduced. Truncated protein was observed in 1326insT GCD.

Plasmids carrying mutant GCD cDNAs were employed also for transient expression of GCD. We have expressed 15 different GCDs (WT-glu1, 72delC, 1326insT, 1263del60, S196P, N370S, L444P, V460V, G202E, D409H, T369M, V294V, L444P+V460V, D409H+T369M, 1263del55). The BSC40 or GCD patient's fibroblast cell lines were infected with VTF7-3 virus. Expression plasmids were introduced into infected cells by lipofection. The cells were harvested after 24 hours and  $\beta$ -glucosidase activity and the amount of immunoreactive GCD was measured<sup>7</sup>. Background  $\beta$ -glucosidase activity of BSC40 cell line was 25 % but in GCD patient's fibroblasts approached to null. In spite of the rather high background of BSC40 cell line of it was possible to distinguish polymorphisms and deleterious mutations in both cases. We have thus confirmed that mutations 72delC, 1326insT, 1263del60,



S196P, G202E, T369M, L444P+V460V, D409H+T369M, 1263del55 have deleterious effect on catalytic activity of GCD.

*This work was supported by grant GAUK 131/97.*

#### REFERENCES

1. Beutler E., Gelbart T.: *Blood Cell. Mol. Dis.* 24, 2 (1998).
2. Horowitz M., Zimran A.: *Hum. Mutat.* 3, 1 (1994).
3. Hodaňová K., Hřebíček M., Červenková M., Mrázová L., Vepřeková L., Zeman J.: *Blood Cell Mol. Dis.* 25, 287 (1999).
4. Pasmanik-Chor M., et al.: *Biochem. J.* 317, 81 (1996).
5. Pasmanik-Chor M., et al.: *Hum. Mol. Genet.* 6, 887 (1997).
6. Ausubel F., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., eds: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1994.
7. Suzuki K.: *Methods Enzymol.* 50, 456 (1978).

### 38 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ STUDIE U ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH PACIENTŮ S FABRYHO CHOROUBOU

ROBERT DOBROVOLNÝ, LENKA DVOŘÁKOVÁ,  
MARTIN HŘEBÍČEK, HELENA POUPĚTOVÁ  
a JANA LEDVINOVA

*Ústav dědičných metabolických poruch, 1. Lékařská fakulta  
UK a Všeobecná fakultní nemocnice 128 08, Praha, Česká  
republika*

Fabryho choroba je dědičná, X-vázaná, recesivní porucha katabolismu glykosfingolipidů která je způsobena deficitem aktivity lyzozomální  $\alpha$ -galaktosidasy A tvořené 429 amino-

#### Tabulka I

Mutace v GLA genu u českých a slovenských pacientů

Pacient č.	Mutace	Exon $\times$ Intron	Mutace	Efekt na kódující sekvenci
1	nová	IVS1	g.1375 T>C	porucha sestřihu hnRNA; inzerce 14 nukleotidů za c. 254 posun čtecího rámce; předčasný STOP kodon (124 AK) R301X
2	publ. <sup>2</sup>	E6	c.961 C>T	Q280K
3	nová	E6	c.898 C>A	L294X
4	nová	E6	c.941 T>C	
5	nová	IVS5	g.10295 A>G	porucha sestřihu hnRNA; inzerce 36 bp za c. 861 posun čtecího rámce; předčasný STOP kodon (270 AK) R342Q
6	publ. <sup>3</sup>	E7	c. 1085 G>A	delece exonu 2 z mRNA (cDNA); posun čtecího rámce; předčasný STOP kodon (70 AK)
7	nová	?	?	

kyselinami (z toho 31 aminokyselin tvoří signální sekvenci).  $\alpha$ -Galaktosidasa je kódována genem GLA lokalizovaným na Xq22.1. Onemocnění je charakterizované ukládáním neodbouraných glykolipidních substrátů enzymu s  $\alpha$ -galaktosou v terminální poloze v lyzosomech postižených buněk<sup>1</sup>.

V našem ústavu je sledován soubor osmnácti rodin s enzymaticky prokázanou Fabryho chorobou z České a Slovenské republiky. Tato choroba je nejčastější z lyzozomálních enzymopatií. Celkem bylo u nás diagnostikováno 34 hemizygotů a 49 přenašeček. Zjišťovali jsme přítomnost mutace v GLA genu u sedmi probandů z těchto rodin přímým sekvencováním RT/PCR produktů. V současnosti se v dalším stupni této studie zabýváme optimalizací vhodné diagnostické metody vyšetření mutace u dalších členů rodiny probanda.

Nalezli jsme pět dosud nepopsaných mutací a dvě již dříve publikované mutace (tab. I). Ze sedmi nalezených mutací se jedná ve dvou případech o záměnu kodonu kódujícího aminokyselinu za STOP kodon (R301X, L294X). Ve dvou případech byla nalezena mutace způsobující záměnu jedné aminokyseliny za jinou (Q280K, R342Q). Další dvě mutace jsou nukleotidové záměny v donorovém místě intronu, způsobující alternativní sestřih (IVS 1<sup>+2</sup> T>C, IVS 5<sup>+3</sup> A>G). V posledním případě jsme našli deleci exonu 2 na úrovni cDNA (mRNA) (tab. I). V některých případech se již podařilo optimalizovat rychlou metodu určení genotypu u příbuzných členů rodiny probanda (např. ARMS, PCR/RFLP).

Identifikace mutací u probandů s Fabryho chorobou v jednotlivých rodinách nám dovolí spolehlivou detekci heterozygotek mezi dalšími členy těchto rodin a umožní zpřesnění prenatalní diagnózy, která je doposud prováděna pouze biochemicky. Společně se souborem již publikovaných údajů mohou výsledky naší studie sloužit k posouzení možné korelace mezi genotypem a fenotypem a k hlubšímu pochopení funkce  $\alpha$ -galaktosidasy A a její regulace na molekulární úrovni.

*Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR (IGA MZ ČR NE 5770-3-99) a projektem Ministerstva školství ČR (VS 96127).*

## LITERATURA

1. Desnick J., Iannou Y. A., Eng C. M., v: *Molecular Basis of Metabolic Disorders*, 7<sup>th</sup> edition (Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Walle D., ed.), str. 2741. McGraw-Hill, New York.
2. Eng C. M., Niehaus D. J., Enriquez A. L., Burgert T. S., Ludman M. D., Desnick R. J.: *Hum. Mol. Genet.* 3, 1795 (1994).
3. Ploos van Amstel J. K., Jansen R. P., de Jong J. G., Hamel B. C., Wevers R. A.: *Hum. Mol. Genet.* 3, 503 (1994).

### 39 DETEKCE CIRKULUJÍCÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚK U PACIENTŮ S MALIGNÍM MELANOMEM

JANA STRÍBRNÁ<sup>a</sup>, PETR POHLREICH<sup>a</sup>,  
RADKA KALBÁČOVÁ<sup>b</sup>, JAROMÍR KŘEMEN<sup>a</sup>,  
ZDENĚK KLEIBL<sup>a</sup> a IVANA KRAJSOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>2. Ústav lékařské chemie a biochemie I.LF UK, U nemocnice 5, 128 53 Praha 2, <sup>b</sup>Onkologické odd. Fakultní Thomayerovy nemocnice, Vídeňská 800, 140 00 Praha 4, <sup>c</sup>Kožní klinika I. LF UK a VFN, U nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Úspěšnost terapie solidních nádorů závisí kromě chirurgického zákroku na monitorování diseminace nádorových buněk krevní cestou. Techniky detekce cirkulujících nádorových buněk jsou založeny na průkazu přítomnosti markeru specifického pro daný typ buněk v krvi pacienta. Jedním z nejvíce sledovaných markerů u maligního melanomu je enzym tyrosinasa, exprimovaný pouze v melanocytech a buňkách melanomu. Protože melanocyty nejsou v krvi přítomny, lze průkaz tyrosinase mRNA použít pro detekci nádorových buněk v cirkulaci. Vlastní detekce je založena na amplifikaci cílových sekvencí polymerasovou řetězovou reakcí. Provádí se na cDNA, která se získá reverzní transkripcí RNA (RT-PCR). Pro vyhledání cílových sekvencí se obvykle používají priméry označované jako HTYR1-4 (cit.<sup>1</sup>). Výsledky dosavadních studií se však vyznačují velkou variabilitou, uváděná četnost pozitivních nálezů se pohybuje v rozsahu 0–100 %, rovněž byl zaznamenán nezanedbatelný počet falešně pozitivních výsledků u zdravých osob<sup>2</sup>. Ve své studii jsme detekci tyrosinase mRNA prováděli: *a*) s klasickými priméry, *b*) s priméry, které byly v 1. stupni amplifikace modifikovány, *c*) pomocí komerčního kitu, který využívá k detekci produktu PCR sondu značenou biotinem (Tyrosinase RT-PCR Elisa).

Pro analýzu bylo použito 5 ml nesrážlivé krve. Frakce mononukleárních buněk byla získána gradientovou centrifugací krve přes vrstvu Histopaque. Celková RNA byla izolována z této frakce fenol-chloroformovou extrakcí v přítomnosti guanidin-isothiokyanátu. cDNA byla připravena reverzní transkripcí buněčné RNA pomocí kitu Expand Reverse Transcriptase. Amplifikace cílových sekvencí byla provedena dvoustupňově s vnějšími a vnitřními priméry (HTYR 1-4). Pro amplifikace delších genových fragmentů v 1. stupni PCR byly navrženy nové priméry (T1 a T2). Velikost produktů amplifikace (207 bp) byla potvrzena elektroforeticky. Integrita RNA byla ověřena paralelní RT-PCR s priméry specifickými pro  $\beta$ -aktin. Homologie se sekvencí tyrosinase genu

byla provedena na základě štěpení restriktasou MvaI. Jako pozitivní kontrola byla testována RNA izolovaná z lidského melanomu a negativní kontroly byly krevní vzorky zdravých osob a pacientů s jiným nádorovým onemocněním. Vzorky RNA byly zároveň zpracovány pomocí komerčního kitu, specifita produktů amplifikace je zde ověřována hybridizací se specifickou sondou.

Hlavním kritériem zařazení pacientů do studie byla lineární hloubka invaze nádoru dle Breslowa >1,5 mm. Celkem bylo vyšetřeno 51 pacientů. U 15 pacientů (stádium I a II) bylo vyšetření provedeno těsně před chirurgickým zákrokem, v ostatních případech (u 28 pacientů ve stádiu II a 2 pacientů ve stádiu III a 6 ve stádiu IV) po určité době od operace, případně po proběhlé chemoterapii. Naše výsledky jsou v souladu s nálezy některých autorů<sup>2</sup>. S priméry HTYR 1-4 byla pozitivita testu výrazně vyšší (12/43 u stádia I/II, 1/2 u stádia III a 6/6 u stádia IV) než při použití nových primérů T nebo komerčního kitu (6/43 u stádia I a II, 1/2 u stádia III a 4/6 u stádia IV).

*Tato práce byla podpořena grantem GA UK 76/1999/C a LF1-206019-2.*

## LITERATURA

1. Smith B., et al.: *Lancet* 338, 1227 (1991).
2. De Vries T. J., et al.: *Br. J. Cancer* 80, 883 (1999).

### 40 ANALÝZA TYROSINASE mRNA V PERIFERNÍ KRVI U MINIATURNÍCH PRASAT S DĚDIČNÝM MELANOMEM

PETR POHLREICH<sup>a</sup>, JANA STRÍBRNÁ<sup>a</sup>,  
ZDENĚK KLEIBL<sup>a</sup> a VRATISLAV HORÁK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>2. Ústav lékařské chemie a biochemie, I. lékařská fakulta UK, U nemocnice 5, 128 53 Praha 2, <sup>b</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Rumburská 89, 277 21 Liběchov

Detekce cirkulujících nádorových buněk má význam pro včasné vyhledání pacientů s rizikem recidivy maligního onemocnění a zahájení adjuvantní terapie. U melanomu lze nádorové buňky v cirkulaci prokázat na základě detekce exprese tyrosinase, klíčového enzymu v biosyntéze melaninu, který je specifickým markerem melanocytů<sup>1</sup>. Amplifikace vhodné sekvence mRNA specifické pro tyrosinasu pomocí reverzní transkripce a polymerasové řetězové reakce (RT-PCR) je vysoce citlivá metoda umožňující detekci jediné nádorové buňky v 10 ml krve. Tímto způsobem jsme prokazovali cirkulující nádorové buňky u laboratorních miniaturních prasat kmene MeLiM (Melanoma bearing Liběchov Minipigs) s pokročilým kožním melanomem<sup>2</sup>. Tento vysoce invazivní hereditární melanom může být vhodným modelem pro studium diseminace nádorových buněk v různých klinických stádiích onemocnění a pro monitorování účinku experimentální terapie pomocí devitalizační techniky. Metoda je založena na ischemizaci kožního tumoru a byla zkoušena u více než 40 postižených zvířat, u nichž navodila v průběhu 4–6 měsíců destrukci melanomových buněk ve všech nádorech a orgánových metastázách<sup>2</sup>.

Celková RNA byla získána z frakce leukocytů izolované

z periferní nesrážlivé krve pomocí centrifugace přes vrstvu Histopaque (Sigma); RNA purifikovaná z kožního melanomu byla použita jako pozitivní kontrola. Zpětná transkripce vzorků celkové RNA probíhala v přítomnosti náhodných hexanukleotidů. Amplifikace pomocí PCR byla prováděna dvoustupňově na cDNA (nested PCR) s priméry, jejichž sekvence byly zastoupeny na různých exonech. Jelikož prasečí tyrosinasový gen nebyl zatím charakterizován, použili jsme pro amplifikaci priméry, které odpovídaly genovým úsekům, jejichž sekvence jsou shodné u různých zvířecích druhů. Specifita zkoušky byla analyzována se vzorky kontrolní RNA. Elektroforéza v agarosovém gelu prokázala s oběma sadami primérů amplifikaci fragmentů očekávané délky. Homologii amplifikovaných fragmentů s tyrosinasovou cDNA potvrdilo restriční štěpení produktů PCR, které bylo provedeno po obou stupních amplifikace. Testování vzorků různě řaděné kontrolní RNA ukázalo, že senzitivita zkoušky se výrazně zvyšuje při dvoustupňové amplifikaci a je srovnatelná s publikovanými údaji. Amplifikace alikvotů vzorků cDNA s priméry specifickými pro  $\beta$ -aktin prokázala přítomnost cDNA specifické pro tento protein, což potvrzuje integritu analyzované RNA. Přítomnost tyrosinasové mRNA byla analyzována v 8 vzorcích periferní krve zvířat s pokročilým melanomem a v 5 kontrolních vzorcích. Pomocí nested RT-PCR se podařilo prokázat tyrosinasovou mRNA u 5 zvířat s melanomem. Výsledky se vzorky krve kontrolních zvířat byly negativní. Průkaz transkripce tyrosinasového genu pomocí PCR se tedy jeví i u prasečího melanomu jako vhodná zkouška pro detekci diseminovaných nádorových buněk.

Tato práce byla podpořena granty: GA ČR 523/98/0229 a LF1-206019-2.

#### LITERATURA

- Smith B., Selby P., Southgate K. P., Pittman K., Bradley Ch., Blair G. E.: *Lancet* 338, 1227 (1991).
- Horák V., Fortýn K., Hruban V., Klauďy J.: *Cell. Mol. Biol.* 45, 1119 (1999).

#### Tabulka I

Mutace genu *BRCA 1* v rizikových rodinách: rozdělení rodin podle počtu jedinců s karcinomem prsu nebo ovária a podle průměrného věku diagnózy nádorového onemocnění

Počet případů karcinomu v rodině		Průměrný věk diagnózy (počet mutací/počet rodin)			Počet mutací/celkový počet rodin	Mutace	
Ca prsu	Ca ovária	≤35	36–50	≥51		název	alterace
1	0	0/14	0/1	0/0	0/15	–	–
2	0	0/0	2/14	0/0	2/14	561del3	Del CAG od 561
≥3	0	0/1	1/6	0/11	1/18	1129del A	Del A 1129–1135
1	1	0/1	1/8	0/10	1/19	Q1111X	C za T na 3450
1	2	0/0	0/0	0/2	0/2	Q563X	C za T na 1806
≥2	1	0/0	1/2	0/1	1/3	–	–
0	1	0/2	0/6	0/0	0/8	2530delAG	Del AG od 2530
0	2	0/0	1/2	0/0	1/2	–	–
						Exon5del	254del78

#### 41 MUTAČNÍ ANALÝZA GENU *BRCA 1* V RODINÁCH S DĚDIČNÝM VÝSKYTEM KARCINOMU PRSU a OVÁRIA

PETR POHLREICH<sup>a</sup>, JANA STRÍBRNÁ<sup>a</sup>, ZDENĚK KLEIBL<sup>a</sup>, MICHAL ZIKÁN<sup>a</sup>, BOHUSLAV KONOPÁSEK<sup>b</sup>, NATALIA JANČÁRKOVÁ<sup>c</sup>, RADKA KALBÁČOVÁ<sup>d</sup> a PAVEL LAZAROV<sup>e</sup>

<sup>a2</sup>. Ústav lékařské chemie a biochemie, 1. lékařská fakulta UK, U nemocnice 5, <sup>b</sup>Onkologická klinika, 1. lékařská fakulta UK, U nemocnice 2, <sup>c</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, 1. lékařská fakulta UK, Apolinářská 18, 120 00 Praha 2, <sup>d</sup>Onkologické oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Vídeňská 800, 140 00 Praha 4, <sup>e</sup>Onkologické centrum Nemocnice Liberec, Husova 10, 460 63 Liberec

Dědičné faktory jsou příčinou více než 5 % karcinomů prsu a ovárií. Analýzou odpovědných genů, *BRCA 1* a *BRCA 2*, lze odhalit v rizikových rodinách nosiče mutací, kteří jsou vysoce ohroženi maligním onemocněním. Dosud bylo popsáno několik set inaktivujících mutací rozptýlených podél celé kódující sekvence těchto genů.

Cílem studie byla analýza mutací genu *BRCA 1* u pacientek pražského regionu z rodin s dědičnou predispozicí k nádorovému onemocnění. Ze vzorků periferní krve byla získána genomová DNA a z lymfocytů izolovaných gradientovou centrifugací celková RNA. cDNA byla získána zpětnou transkripcí buněčné RNA. Analýza byla prováděna v pěti překrývajících se fragmentech zahrnujících celou kódující sekvenci genu. Exon 11, který tvoří asi 60 % této sekvence, byl rozdělen na tři fragmenty, které byly amplifikovány na genomové DNA. Úseky genu obsažené v exonech 2–10 a 12–24 byly amplifikovány dvoustupňově na cDNA. K průkazu mutací byl využit tzv. PTT-test (protein truncation test), kterým se na rozdíl od ostatních screeningových technik mutace detekují na úrovni proteinu. K přesné charakterizaci mutací a k analýze exonů 2–5 bylo použito cyklické sekvenování příslušných produktů PCR.

PTT analýza prokázala u 81 pacientek z rizikových rodin čtyři různé inaktivující mutace. Tyto mutace zahrnovaly dvě delece vedoucí k posunu čtecího rámce při translaci a dvě nonsens mutace. Všechny zasahovaly do různých míst jedenáctého exonu. Sekvenování produktů RT-PCR odhalilo úplnou ztrátu exonu 5, který tvoří část „RING finger“ domény klíčové pro funkci proteinu BRCA 1, a novou delecí CAG na počátku exonu 8 způsobující ztrátu glutaminu 148 v proteinu BRCA 1. Rodinní příslušníci (celkem pět přímých příbuzných) byli vyšetřováni u čtyř nosičů mutací a shodné genové alterace byly prokázány ve třech rodinách (u sestry a 2× u dcery). Přehled o vyšetřovaných rodinách a výsledcích analýzy podává tabulka I.

Nízký záchyt mutací v testované skupině rizikových rodin může souviset s méně přísnými kritérii pro výběr pacientek. Kromě toho, PTT analýzou lze detekovat pouze asi 80 % mutací, které vedou ke zkrácení syntetizovaného proteinu. V naší populaci rovněž nebyl studován podíl jednotlivých genů na dědičné predispozici ke karcinomu prsu a ovária.

*Tato práce byla podpořena granty GA UK 25/2000/C, LF1-206019-2 a z výžerku Běhu Terryho Foxe.*

#### 42 MUTATION ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF CARRIERS IN X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY (X-ALD) FAMILIES. THE FIRST POLYMORPHISM CAUSING AN AMINO ACID EXCHANGE WITHIN THE ALDP-GENE

GABRIELA ŠTORKÁNOVÁ<sup>a</sup>, LENKA DVOŘÁKOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN HŘEBÍČEK<sup>a</sup>, JIŘÍ ZEMAN<sup>a</sup>, JANA HUJOVÁ<sup>a</sup>, G. UNTERRAINER<sup>b</sup>, and J. BERGER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute for Inherited Metabolic Disorders, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic,* <sup>b</sup>*Brain Research Institute, University of Vienna, Austria*

X-ALD patients carry mutations in the ALDP gene, encoding a peroxisomal membrane protein. X-ALD is chara-

Table I

Mutations in ALDP gene in Czech and Slovak patients

Patient no.	Mutation	Phenotype	Exon	Mutation (ATG = 1)	Effect on coding sequence
1	novel	ccALD	1	c.97–100 del TACC	frameshift from 33rd AA protein is truncated to 66 AA
2	novel	AMN	1	c.296 C>A	A99D
3	novel	ADO	1	c.649 A>G	K217E
4	novel	ccALD	1 + IVS1	g.697–925 del	deletion of 233rd to 300th AA
5	novel	AMN	3	c.1092 del C	frameshift from 364th AA protein is truncated to 365 AA
6	novel	ccALD	8	c.1823 G>A	G608D
7	novel	asymptomatic	9	c.1898 G>T	S633I
8	novel	ccALD	9	c.1979 G>C	R660P
9	known	AMN	1	c.293 C>T	S98L
10	known	ccALD	5	c.1415–1416 del AG	frameshift from 472nd AA protein is truncated to 554 AA
11	known	AMN	6	c.1553 G>A	R518Q

cterised by impairment of VLCFAs  $\beta$ -oxidation. In our Institute, nine Czech and two Slovak unrelated X-ALD families are followed. We examined the ALDP mutations in probands from these families by direct sequencing of RT/PCR products. We developed PCR/RFLP methods for genotyping of family members of each proband.

We have found eight novel and three previously described mutations (Table I). In the patient no. 3 we have detected two novel one-base substitutions in exon 1 (c.38 A>C and c.649 A>G), which cause the change of amino acid (N13T and K217E). Both point mutations were expressed *in vitro* to find out whether they are deleterious mutations or neutral polymorphisms. Each of the mutations was introduced separately into the ALDP expression plasmid. Transfection of plasmid carrying K217E mutation into X-ALD fibroblasts was not able to restore defective  $\beta$ -oxidation. In contrast, the second nucleotide exchange (N13T) does not inhibit the ALDP function. Therefore N/T13 represents the first polymorphism causing an amino acid exchange within the ALD-gene. As this polymorphism was not observed within 300 X-ALD patients sequenced so far world wide it seems to be very rare or unique.

We have found another four polymorphisms in the ALDP genes of our patients. Two of them are known: c.2246 G>C (8 bp downstream of the stop codone, patient no. 2, 6, 9), c.1548 G>A (L516L, patient no. 2, 6) and two, which have not been yet described: c.-59 C>T in promoter region (patient no. 6) and c.2019 C>T (F673F, patient no. 9). The incidence of these two polymorphisms at 100 controls (50 males and 50 females) was 7 % and 1 %, respectively.

In three families (no. 1, 4, 9) we have observed de novo mutations. We have examined 22 family members by PCR/RFLP method, eight of them were heterozygotes and one was affected hemizygote.

*This work was supported by a grant from Ministry of Health, Czech Republic (IGA MZ ČR NE 5770-3-99) and by the Austrian Science Foundation, project No. P12073-MED.*



#### 43 MUTATIONAL ANALYSIS OF SIX PATIENTS WITH ACID SPHINGOMYELINASE DEFICIENCY (NIEMANN-PICK DISEASE A OR B) OF DUTCH OR TURKISH ORIGIN

JAKUB SIKORA, HANA PEREIRA,  
and MILAN ELLEDER

*Institute for Inherited Metabolic Diseases, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Ke Karlovu 2, 128 08, Prague, Czech Republic*

Niemann-Pick disease (NPD) type A and B are caused by deficiency of lysosomal acid sphingomyelinase (ASM, E.C. 3.1.4.12) resulting in lysosomal accumulation of sphingomyelin. Types A and B NPD have autosomal recessive mode of inheritance. Type A NPD is a fatal, neurovisceral disorder of infancy, whereas type B NPD is characterized primarily by visceral involvement and survival till adulthood. Both disorders have higher ethnic prevalence in the Ashkenazi Jewish population than in general population. There are 21 known mutations in the gene for acid sphingomyelinase to date.

Genomic DNA of six (twelve alleles) Dutch NPD type A or B patients was analyzed in search for mutations in the ASM gene. Genomic DNA was isolated from cultured leukocytes or fibroblasts. Exons with neighbouring intronic areas were PCR amplified, the PCR products were purified and then sequenced. Resultant DNA sequences were searched for mutations.

Five novel mutations in the ASM gene were found, all of them being single nucleotide substitutions. One mutation was found in exon two (position 1939) of the ASM gene resulting in the substitution of histidin by tyrosine (H319Y). One mutation was found in exon three (position 3147) resulting in the substitution of proline by serine (P371S). Two mutations were found in exon five (position 3855 and 3891) resulting in the substitution of phenylalanine by serine (F463S) and in the substitution of proline by leucine (P475L), respectively. One mutation was found in exon six (position 4232) resulting in the substitution of tyrosine by histidine (Y537H). Mutations Y537H, H319Y, P371S were found in homozygous state. One patient was heterozygote for mutations F463S and P475L.

According to available clinical data mutations Y537H, F463S and P475L were associated with phenotype A NPD. Genotype-phenotype correlation of the mutation H319Y could not be done due to lack of relevant clinical data.

Known mutation  $\Delta R608$  was found in homozygous state in two NPD type B patients. This arginine deletion in exon six in the gene for acid sphingomyelinase was found to be prevalent mutation in the north-african region of Maghreb. According to literary sources  $\Delta R608$  was always associated with milder nonneuropathic type of NPD (Ref. <sup>1</sup>).

Novel mutations were verified by restriction analysis using mutation specific restriction endonucleases.

#### LITERATURA

1. Vanier M. T., Ferlinz K., Rousson R., Duthel S., Louisot P., Sandhoff K., Suzuki K.: Hum. Genet. 92, 325 (1993).

#### 44 GENETICKÝ POLYMORFISMUS BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ U PACIENTŮ S LYMFOMY

JANA ŠARMANOVÁ, IVAN GŮT a PAVEL SOUČEK

*Odborná skupina biotransformací, Centrum hygieny práce a nemocí z povolání, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10*

Geneticky polymorfní biotransformační enzymy cytochromy P450 (CYP), epoxid hydrolasa (EPHX) a glutathion S-transferasy (GST) metabolizují řadu xenobiotik (léky, karcinogeny, látky životního prostředí). Pravděpodobně více než 90 % karcinogenezi je zapříčiněno faktory životního prostředí (např. kouření, strava nebo expozice v povolání). Individuální efektivita v detoxifikaci xenobiotik může ovlivnit vnímavost ke vzniku rakoviny.

Metodou polymerasové řetězové reakce a analýzou délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP) jsme sledovali polymorfismus v genu *CYP1A1* (3' přiléhající oblast), *CYP2E1* (5' přiléhající oblast a intron 6), *EPHX* (exon 3 a exon 4), *GSTM1* (delece), *GSTP1* (exon 5) a *GSTT1* (delece) ve skupině pacientů s lymfomy (76 Hodgkinských a 143 ne-Hodgkinských lymfomů) a v kontrolní skupině (450 jedinců). Hodgkinské (MH) a ne-Hodgkinské (NHL) lymfomy se od sebe liší biologickým a histogenetickým původem i klinickým chováním onemocnění. Vznik lymfomů zatím nebyl přesně objasněn. V řadě případů byly nalezeny genetické abnormality (translokace na chromozomech nesoucích některé onkogeny). Nové techniky v molekulární biologii mohou pomoci k objasnění molekulární podstaty tohoto onemocnění. Cílem této studie bylo zjistit, zda existuje vztah mezi polymorfismem biotransformačních enzymů a individuální vnímavostí ke vzniku lymfomů.

Statistickým zpracováním výsledků genotypování u skupiny pacientů a kontrol jsme našli významně odlišné frekvence genotypů *CYP2E1*-intron 6 ( $p = 0,03$ ), dále *EPHX*-exon 3 u mužů ( $p = 0,005$ ) a také *GSTP1*-exon 5 u MH ( $p = 0,044$ ), především u žen s MH ( $p = 0,035$ ). Při podrobnější analýze vlivu genotypů na některé klinicko-patologické charakteristiky (klinické stádium, stupeň a velikost tumoru, primárně extranodální lokalizace, výsledek léčby) jsme zjistili vliv *CYP2E1*-intron 6 a *GSTP1*-exon 5 na stupeň NHL ( $p = 0,01$ , resp.  $p = 0,0026$ ), dále vliv *EPHX*-exon 4 a *GSTP1*-exon 5 na velikost tumoru ( $p = 0,012$ , resp.  $p = 0,008$ ). Dále jsme analyzovali rozdíly mezi MH a NHL. Statisticky významně se lišil věkový průměr pacientů ( $p < 0,0001$ ), přítomnost celkových příznaků ( $p = 0,018$ ) i výsledek terapie ( $p < 0,0001$ ).

*Tato práce byla podpořena grantem IGA 1850-5.*

#### 45 BODOVÉ MUTACE V K-ras GENU U ADENOMATÓZNÍCH POLYPŮ V TLUSTÉM STŘEVĚ

MARTIN BERÁNEK<sup>a</sup>, JAN BUREŠ<sup>b</sup>,  
STANISLAV REJCHRT<sup>b</sup>, KAREL DĚDIČ<sup>c</sup>,  
JANA KLÁNOVÁ<sup>d</sup> a VLADIMÍR PALIČKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, <sup>b</sup>Komplementární centrum vnitřního lékařství, <sup>c</sup>Fingerlandův patologický ústav, FN Hradec Králové, 500 05 Hradec Králové, <sup>d</sup>Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Všeobecně akceptovanou hypotézou vzniku většiny kolorektálních karcinomů je tzv. adenom-adenokarcinomová sekvence<sup>1</sup>. Nejrizikovější z hlediska možné malignizace jsou mnohočetné vilózní a silně dysplastické adenomy o velikosti nad 2 cm, nejméně pak ojedinělé tubulární mírně dysplastické adenomy o velikosti několika milimetrů. Bodové mutace v kodonu 12 K-ras genu (Kirsten ras 2 gen; 12p12.1) mohou být jedním z faktorů, které inhibicí GTPasové aktivity kódovaného p21<sup>ras</sup> proteinu přispívají k nekontrolované proliferaci a maligní transformaci buněk tlustého střeva. Tyto mutace se v České republice vyskytují asi u 35 % sporadicky vzniklých kolorektálních karcinomů<sup>2</sup>. Cílem práce bylo prokázat existenci těchto mutací již ve stádiu kolorektálních adenomů a porovnat výsledky molekulárně biologických analýz s jejich klinicko-patologickou klasifikací.

Vyšetřený soubor tvořilo 19 bioptických vzorků adenomatózních střevních polypů o velikosti 1–3 mm<sup>3</sup>, které byly odebrány při kontrolním koloskopickém vyšetření 10 mužů a 9 žen průměrného věku 63±9 let. K DNA analýze byla použita metoda seminested PCR/RFLP (cit.<sup>3</sup>). Po finální restrikci *Mva*I restrikčním enzymem vznikl v případě wild-type alely fragment délky 106 bp, v případě bodové mutace v kodonu 12 zůstal zachován neštěpený PCR produkt o délce 135 bp. Konfirmace výsledků a typizace bodových mutací byla provedena sekvenací PCR produktu na kapilárním sekvenátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA).

Mutace v kodonu 12 byly zjištěny u 7 z 19 adenomů (37 %), což koresponduje s frekvencí výskytu těchto mutací v kolorektálních karcinomech. Výsledky svědčí o tom, že bodové mutace v K-ras genu jsou časnou genetickou změnou související již s benigním rozvojem kolorektálních tumorů, které doprovázejí klonální rozvoj tumoru do stádia karcinomu. V našem souboru byly prokázány dva typy bodových mutací: substituce GGT (Gly)→GTT (Val) a GGT→AGT (Ser). V souladu s adenom-adenokarcinomovou teorií vzniku kolorektálního karcinomu byl výskyt mutací častější u adenomů vilózních, adenomů se silnou či střední dysplasií a u adenomů větších než 1 cm. 3 ze 7 (43 %) pacientů s vyšetřenou mutací v K-ras genu mělo v anamnéze záznam o předchozím odstranění adenomatózního polypu či kolorektálního karcinomu. U 5 z nich se v průběhu následujících 6 měsíců objevily nové adenomatózní polypy. Naopak, nové polypy byly zjištěny pouze u 2 z 12 osob (17 %,  $p < 0,02$ ) bez předchozího nálezu polypu v anamnéze a prokázané bodové mutace v K-ras genu.

Aplikace tohoto molekulárně biologického vyšetření by v klinické praxi mohla nejen doplnit histopatologickou klasi-

fikaci adenomu, ale také upřesnit odhad pravděpodobnosti vzniku nových adenomatózních polypů jako predisponujícího faktoru pro rozvoj kolorektálního karcinomu.

Sekvenování bylo zčásti podpořeno grantem č. VS96096 MŠMT ČR.

#### LITERATURA

1. Fearon E. R., Vogelstein B.: *Cell* 61, 759 (1990).
2. Beránek M., Bureš J., Palička V., et al.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 723 (1999).
3. Carpenter K. M., Durrant L. G., Morgan K., et al.: *Clin. Chem.* 42, 904 (1996).

#### 46 POŠKODENIE DNA V LYMFOCYTOCH V CHRI – BENEFIČNÝ ÚČINOK LOSARTANU

ZORA KRIVOŠÍKOVÁ<sup>a</sup>, VIERA SPUSTOVÁ<sup>a</sup>,  
KATARÍNA ŠEBEKOVÁ<sup>a</sup>, MÁRIA DUŠINSKÁ<sup>b</sup>,  
PAVOL BLAŽÍČEK<sup>c</sup>, AUGUST HEIDLAND<sup>d</sup>  
a RASTISLAV DZÚRIK<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Oddelenie experimentálnej a aplikovanej biochémie, <sup>b</sup>Oddelenie experimentálnej a aplikovanej genetiky, <sup>c</sup>Kliniky imunológie a farmakoterapie, Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Bratislava, <sup>d</sup>Nemocnica ministerstva vnútra, Bratislava, Slovenská republika, <sup>e</sup>Univerzita Würzburg, SRN

Chronická renálna insuficiencia (CHRI) je spojená s retenciou rôznych uremických toxínov, zvýšenou aktivitou kyslíkových voľných radikálov (OFR), zníženou antioxidačnou kapacitou, zníženou aktivitou OFR-inaktivačných enzýmov<sup>1</sup> a hromadením produktov pokročilej glykácie (AGEs)<sup>2</sup>. Dochádza tiež k zmenám hladín katabolických cytokínov a profibrotických rastových faktorov, ako je IGF-1, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGF a PDGF, čo sa tiež odráža na zvýšenej ORF-aktivite<sup>3</sup>. Všetky tieto faktory sa môžu podieľať na poškodení DNA a tým prispievať k progresii obličkového ochorenia.

Renálna morfológia CHRI je charakterizovaná rozvojom glomerulosklerózy a tubulointersticiálnej fibrózy, ktoré sú zapríčinené rôznymi faktormi, vrátane systémovej a glomerulárnej hypertenzie, proteínúrie a stimulácie renín-angiotenzín-aldosterónového systému (RAAS). Blokáda angiotenzínových (AT1) receptorov môže hrať významnú úlohu v obličkách v CHRI (cit.<sup>4,5</sup>).

Cieľom našej štúdie bolo otestovať, či je model remnantnej obličky vhodný na sledovanie poškodenia DNA v lymfocytoch, a ak áno, aký je vplyv losartanu (antagonistu AT1 receptorov) na DNA poškodenie v modeli remnantnej obličky potkana.

Potkany, samce kmeňa Wistar (180–220 g) sme podrobili 4/6 nefrektómii a randomizovali do placebovej skupiny (Nx, n = 17) a skupiny liečenej losartanom v dávke 20 mg.l<sup>-1</sup> pitnej vody (NxL, n = 16). Sham operované potkany slúžili ako kontroly (Sham, n = 16). Zvieratá boli párovo chované. Štúdia trvala 3 mesiace. Systolický krvný tlak (SBP) sme merali pred operáciou a na konci experimentu. Krv sme odoberali z brušnej aorty v tiopentalovej narkóze. Stanovovali sme sérový kreatinín, močovinu, malondialdehyd (MDA), lipofuscín (LF)

a hipurát. Na sledovanie DNA zlomov sme použili metódu comet assay<sup>6</sup>. Vyzolované lymfocyty zakotvené v agarózovom géle sme zlyzovali a jadrá podrobili alkalickéj elektroforéze. „Kométy“ sme zafarbili so 4,6 diamino-2-fenylindolom a vyhodnotili vo fluorescenčnom mikroskope. Výsledky sme štatisticky spracovali v programe Statgraphics (Anova, LSD test).

Tabuľka I  
Účinok losartanu na SBP a renálne funkcie

	Sham	Nx	NxL
SBP [mmHg]	112±2,3	120±5,4 <sup>a</sup>	103,0±16,5 <sup>a,b</sup>
S-kreatinín [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	46±1,9	102±14,2 <sup>a</sup>	88,2±6,2 <sup>a,b</sup>
Proteínúria [ $\text{mg.d}^{-1}$ ]	10±1	20±2 <sup>a</sup>	20±4 <sup>a</sup>
S-hipurát [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	8,1±0,5	15,1±2,7 <sup>a</sup>	16,4±2,1 <sup>a</sup>
MDA [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	2,2±0,1	5,4±1,0 <sup>a</sup>	6,2±1,3 <sup>a</sup>
LF [a.u.]	7,9±0,2	9,2±1,3	9,4±0,6
DNA zlomy [% DNA]	14,7±1,2	57±2,1 <sup>a</sup>	23,3±3,3 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Významnosť vóči Sham, <sup>b</sup> významnosť vóči Nx,  $p < 0,05$

Podávanie losartanu remnantným potkanom významne znížilo SBP a renálne funkcie (tab. I). DNA poškodenie v Nx skupine bolo veľmi silné, pričom losartan mal výrazný protektívny účinok; DNA poškodenie v NxL skupine sa znížilo takmer na úroveň Sham skupiny (tab. I). Zistili sme významné korelácie medzi DNA zlomami a sérovým kreatinínom ( $r = 0,882$ ,  $p < 0,001$ ), DNA zlomami a hipurátom ( $r = 0,505$ ,  $p < 0,01$ ) a DNA zlomami a MDA ( $r = 0,472$ ,  $p < 0,05$ ).

Model remnantnej obličky potkana je vhodný na sledovanie DNA poškodenia v CHRI a liečba s losartanom účinne zabránila poškodeniu DNA v izolovaných lymfocytoch.

#### LITERATÚRA

1. Vaziri N. D., Oveisi F., Ding Y.: *Kidney Int.* 53, 1748 (1998).
2. Iehara N., Takoka H., Yamada Y.: *Kidney Int.* 50, 1166 (1996).
3. Abdullah M. S., Wild G., Jacob V.: *Miner. Electrolyte Metab.* 23, 237 (1997).
4. Goodfriend T. L., Elliot M. E., Catt K. J.: *N. Engl. J. Med.* 334, 1649 (1996).
5. Ichikawa I.: *Kidney Int.* 50, 684 (1996).
6. Collins A., Dušinská M., Gedik C. M.: *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl 3), 465 (1996).

#### 47 OPTIMALIZATION OF EXTRACTION METHOD FOR DETECTION OF TRANSGENIC DNA IN FOOD

KAMILA ZDEŇKOVÁ, JARMILA PAZLAROVÁ,  
and KATEŘINA DEMNEROVÁ

*Institute of Chemical Technology, Department of Biochemistry and Microbiology, ICT Prague, Technická 5, 166 28, Prague 6, Czech Republic*

For more than 10 years, modern methods for preparation of new commercially available organisms have been used.

These methods are based on molecular genetics techniques, especially on the transfer of chosen genes to the new organisms creating new properties. These organisms are called genetically modified (GMO). Development of modern biotechnologies allows to obtain such changes, which are usually not occurring in nature. Application of these modern technologies could help in the agriculture and in the food processing to solve the problem of the food-deficiency, which is caused by continual increasing of population, especially in the countries of the third world. Although the advantages of genetically modified products are evident, the public acceptance of GMO is in the most cases negative. For possible control of GMO products in the future is inevitable to establish new methods for GMO analysis<sup>1</sup>.

Our work is focused on the detection of transgenic DNA from GMO by PCR method<sup>2</sup>. As a model system genetically modified corn was used. Because PCR is a very sensitive technique demanding purified DNA samples, the extraction method is essential step in the whole procedure<sup>3</sup>. Several types of extraction methods suitable for an isolation of the genomic (chromosomal) DNA from plant cells were tested. The Wizard<sup>TM</sup> (Promega, USA) which is the commercial test was used. Further genomic DNA was extracted by the alkaline lysis, ROSE method, CTAB method and by the combination of CTAB and phenol-chloroform extraction<sup>4</sup>. The quantity of extracted DNA was determined by UV-spectrometry at wavelength 260 nm. A purity of extracted DNA was determined by absorption measurement at 260 and 280 nm.

The ability of amplification of extracted DNA was proved by the PCR reaction. Complementary primers to conservative non-coding sequence of the chloroplast genome<sup>5</sup> were used. The size of amplified products was between 500 and 600 bp.

Extracted DNA will be tested by PCR (Ref.<sup>6</sup>) on the presence of putative transgene. The aim of the project is development of complete protocol of transgenic DNA detection which will include: *i*) extraction of DNA, *ii*) PCR, *iii*) identification of product.

*The work was financed from grant FRVŠ 771/G1/2000.*

#### LITERATURA

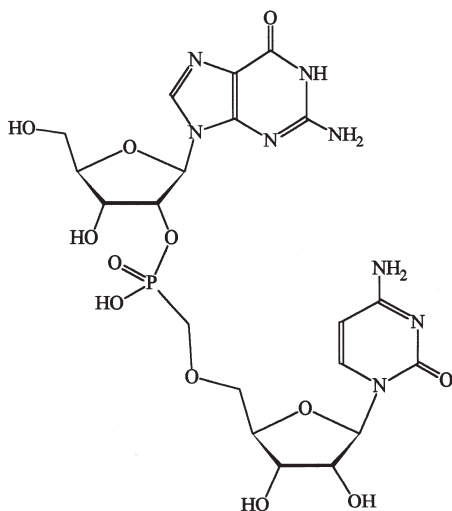
1. *Směrnice číslo 90/220/EHS o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí*, str. 15, 1990.
2. Lin J.-J., Kuo J., Saunders J. A., Beard H. S., MacDonald M. H., Kenworthy W., Ude G. N., Matthews B. F.: *Plant Mol. Biol. Reporter* 14, 156 (1996).
3. Zimmermann A., Lüthy J., Pauli U.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 207, 81 (1998).
4. Hupfer Ch., Hotyél H., Sachse K., Engel K.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 205, 442 (1997).
5. Pietsch K., Waiblinger H. U., Brodmann P., Wurz A.: *Dtsche Lebensm.-Rundsch.* 93, 35 (1997).
6. Hübner P., Studer E., Häfliger D., Stadler M., Wolf Ch., Looser M.: *Accred. Qual. Assur.* 4, 292 (1999).

#### 48 PĚSTOVÁNÍ A POLARIZOVANÁ RAMANOVA SPEKTROSKOPIE MONOKRYSTALU FOSFONÁTOVÉHO ANALOGA GpC

JANA ZACHOVÁ<sup>a</sup>, KATEŘINA CHMELOVÁ<sup>a</sup>,  
PIERRE-YVES TURPIN<sup>b</sup> a JOSEF ŠTĚPÁNEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2, <sup>b</sup>Université P. et M. Curie, L.P.B.C., 4 Place Jussieu, Case 138, Paris Cedex 05, F-75252, France

Monokrystal 5'-O-(guanosa-2'-O-phosphonomethyl)cytidinu (Gp<sub>C</sub>) představuje zatím jedinou známou krystalickou strukturu nukleotidu s izopolární a neizosterní modifikací internukleotidové spojky. Tento typ modifikace, spočívající v inzertování methylenové skupiny do cukr-fosfátové vazby, se zdá být perspektivní pro užití v „antisense“ strategiích. Virostatických a kancerostatických účinků se dosahuje navázáním syntetického oligonukleotidu na cílovou sekvenci v mRNA, čímž se zabrání transkripci patogenního proteinu. Klíčovou podmínkou pro účinné *in vivo* použití syntetických oligonukleotidů je právě nalezení vhodné chemické modifikace internukleotidové spojky, která by zaručila rezistenci vůči nukleasám a současně nenarušila hybridizační vlastnosti nukleotidu.



Monokrystaly Gp<sub>C</sub> ve tvaru bezbarvých, pentagonálních destiček o rozměrech až 0,4×0,25×0,15 mm byly vypěstovány metodou sedící kapky odpařováním vodného roztoku v přítomnosti hořčičných solí (Gp<sub>C</sub>:Mg<sup>2+</sup> = 2:1 mol; pH 3,6) ze zárodku. Krystalová struktura<sup>1</sup> obsahuje čtrnáct molekul vody a dvě symetricky nezávislé molekuly Gp<sub>C</sub>, lišící se konformací internukleotidové spojky (*g-gt* a *tgt*) a tím i intramolekulární vzdáleností rovin bází G-C (3,6 Å a 3,3 Å). Konformace nukleosidu však je shodná a odpovídá konformaci u přirozeného GpC(2'-5') (cit.<sup>2</sup>): cytidiny v C2'-*endolanti* a guanosiny v C3'-*endol/syn* konformaci.

Vypěstované monokrystaly byly využity jako referenční vzorky pro interpretaci vibračních spekter modifikovaných nukleotidů daného typu. Polarizovaná Ramanova vibrační spektra byla měřena při geometrii zpětného rozptylu na dobře vyvinuté ploše (001). Měření byla prováděna na CCD spektrometru Jobin Yvon T64000 vybaveném konfokálním mikro-

skopem. Laserový svazek (Ar<sup>+</sup> laser, linie 488 nm) byl fokusován na stopu o průměru 2 mm na povrchu krystalu. Byla získána spektra odpovídající čtvercům složek *xx*, *yy* a *xy* Ramanova tensoru. Vysoká anizotropie Ramanova spektra potvrzuje velmi dobrou optickou kvalitu povrchu vzorku v místě měření.

Získaná spektra umožňují zjistit korelaci mezi konformací a vibračními módy internukleotidové spojky (skupina pásů v oblasti 870 cm<sup>-1</sup>). Dále bylo možné zjišťovat vliv rozdílné konformace spojky na vibrační módy cukrů a bází. Zatímco u cukrů zřejmě dochází k posunům frekvencí spřažených vibrací (pásky v oblasti 1020–1180 cm<sup>-1</sup>), vibrace lokalizované na vzdálenějších bázích nevykazují měřitelné rozdíly.

Autoři děkují Ing. Ivanu Rosenbergovi, CSc. a RNDr. Zdeňkovi Točkovovi, CSc. za poskytnutí suroviny Gp<sub>C</sub>, která byla syntetizována publikovaným postupem<sup>3</sup>.

#### LITERATURA

1. Zachová J., Císařová I., Buděšínský M., et al.: *Nucleosides Nucleotides* 18, 2581 (1999).
2. Krishnan R., Seshadri T. P.: *Biopolymers* 34, 1637 (1994).
3. Rosenberg I., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 52, 2572 (1987).

#### 49 EVOLUČNÍ VÝPOČETNÍ TECHNIKY A JEJICH APLIKACE

JIŘÍ KUBALÍK a JIŘÍ LAŽANSKÝ

Gerstnerova Laboratoř, ČVUT FEL, Technická 2, 166 27 Praha 6

Evoluční výpočetní techniky představují třídu optimalizačních metod, jejichž činnost je založena na principu vyléčení kvalitního řešení v procesu simulované evoluce. Původní myšlenka inspirovat se přírodou a využít mechanismy přirozené selekce a genetické rekombinace v umělých systémech se objevila již na počátku 60-tých let. Za jednoho z prvních průkopníků v oblasti evolučních výpočetních technik je považován Lawrence Fogel, který v roce 1960 přišel s metodou zvanou evoluční programování (EP). Byla to v podstatě iterativní výhradně mutační procedura, která byla použita pro vývoj konečných stavových automatů. O čtyři roky později a zcela nezávisle na Fogelovi, Rechenberg, Schwefel a Bienert z Berlínské univerzity „vynalezli“ evoluční strategii (ES), které používali pro optimalizaci návrhu převodůvek. Při hledání optimálního návrhu ES vycházeli z celé populace existujících řešení, což je podstatným rysem dnešních evolučních technik. Kromě mutace, tj. modifikace parametrů jednoho řešení, bylo v ES použito i náhodné kombinování vlastností dvojice stávajících řešení. Právě rekombinace neboli křížení je další klíčovou operací evolučních technik.

Velký rozmach evolučních výpočtů přišel až s genetickými algoritmy (GA). Za jejich otce je považován americký biolog John Holland, jenž se snažil pomocí modelování evolučních procesů algoritmickou cestou o vysvětlení diverzity druhů v přírodě<sup>1</sup>. Mezi základní operace algoritmu patří selekce, křížení jedinců a mutace. GA pracují s populacemi jedinců,



kteř se vyvíjejí v diskřetních krocích tzv. generacích. Jediněm se zde rozumí jisté potenciální řešení dané úlohy, které je reprezentováno kódem, zpravidla ve formě řetězce fixní délky tvořeného symboly z nějaké abecedy. Tento řetězec, v GA nazývaný chromozom, lze pak považovat za jakousi genetikou informaci genotyp o kandidátovi řešení problému. Vlastnosti samotného řešení jsou pak vlastně fenotypem, který danému genotypu odpovídá. Kódování musí být voleno tak, aby ke každému genotypu bylo možno určit fenotyp, tedy kandidáta řešení problému, s následnou možností stanovit jeho kvalitu tzv. fitness. To je jediná informace o řešeném problému, kterou GA potřebují znát pro efektivní vyšetření prohledávaného prostoru. Nevyžadují žádnou další apriorní znalost, jako např. derivace fitness funkce apod. Jinými slovy, pro GA je postačující, že dokážou rozlišit mezi horším a lepším řešením popř. využívají relativní rozdíly mezi nimi. Přitom na povaze fitness funkce nezáleží. Může být spojitá i diskřetní, může obsahovat šumovou složku, ohodnocení může zahrnovat více kritérií apod.

GA jsou algoritmicky velice jednoduché. Na počátku se zpravidla náhodně vygeneruje populace vhodně zvoleného počtu chromozomů. Každý chromozom je transformován na odpovídající fenotyp, který určuje jeho fitness. Zároveň se vyhodnotí celková a průměrná fitness přes celou populaci. Tělo GA je tvořeno hlavním cyklem, v němž dochází k vývoji populace. Nejprve se naplní tzv. mezipopulace chromozomy, které budou použity při vytváření nové populace. K tomu slouží operátor selekce, který simuluje přirozený výběr životaschopných jedinců. Mělo by platit to, že chromozomy reprezentující kvalitní řešení budou mít četnější zastoupení v mezipopulaci a tím i jejich genetický materiál bude častěji použit při formování nové populace a naopak. Z chromozomů dané mezipopulace jsou potom pomocí křížení a mutace vygenerovány nové chromozomy, ze kterých se vytvoří nová populace. Z té se znovu odstartuje proces vytváření následné populace atd. Důležitou vlastností GA je to, že genetická informace uložená v celé populaci je zpracovávána paralelně a ne odděleně chromozom po chromozomu. To je činí výrazně robustnějšími a odolnějšími vůči uváznutí v lokálním extrému. Po jistém počtu generací potom populace zkonverguje k úzké oblasti prohledávaného prostoru, ve které už se může nacházet řešení požadované kvality. Výpočet probíhá dokud není splněna ukončovací podmínka. Ta může být zadána počtem generací, počtem aplikací operátoru křížení apod. Nejlepší řešení, které se vyskytlo během celého výpočtu představuje nalezené řešení. Výstupem GA ale nemusí být pouze jediné řešení. Výhodou GA je, že většinou je v poslední populaci dokonce několik různých, ale stejně kvalitních řešení, ze kterých si uživatel může vybrat. Připomeňme, že GA používají pravděpodobnostní přechodová pravidla. Pravděpodobnostní

složka, která je obsažena v každém operátoru a strategii opět výrazně snižuje pravděpodobnost uváznutí v některém lokálním optimu.

GA představují skutečně univerzální optimalizační techniky. Jsou používány v mnoha oblastech jako řízení, designu, rozvrhování, zpracování obrazu, robotice, marketingu, medicíně a mnoha dalších.

V minulém období vzniklo na našem oddělení několik prací, které byly zaměřeny na ověření použitelnosti GA pro řešení konkrétních úloh rozvrhování, problému obchodního cestujícího, problému optimálního pokrytí, hledání závislostí v datech apod. GA byly také použity v systému pro predikci výsledků srdečních operací. Systém funguje na principu metody případového usuzování. Každý pacient je popsán  $n$  atributy. Pro odhadnutí výsledku operace se v databázi známých případů vyhledá v jistém smyslu nejbližší neboli nejpodobnější. Metrika podle níž se stanovuje podobnost mezi případy používá různé váhy u jednotlivých atributů. Pro účely predikce je nutné stanovit důležitost jednotlivých atributů, které nejlépe postihují množinu známých případů. Jedná se tedy o nalezení optimálního vektoru vah v  $n$ -rozměrném prostoru. Systém řeší tuto úlohu automatického ladění vah atributů pomocí genetického algoritmu.

Aktuálně byly také navrženy a odzkoušeny nové operátory křížení tzv. částečně inverzní křížení (PRX Partially Randomised X-over), které jsou určeny pro GA používající binární reprezentaci<sup>2</sup>. Dosažené výsledky ukázaly zejména na schopnosti PRX operátorů výrazně zkvalitnit a zefektivnit konvergenci GA.

Evoluční výpočetní techniky a zvláště genetické algoritmy představují zajímavou alternativu pro řešení optimalizačních úloh. Vedle popsaných výhod však vykazují i některé nepříznivé jevy. Mezi hlavní patří problémy spojené s konvergencí k optimálnímu řešení, s omezeními kladenými na hledané řešení, s optimální konfigurací algoritmů apod. Je zřejmé, že po počátečním bouřlivém a úspěšném rozvoji docházejí GA v současné době do stavu, kdy už nestačí pouze ladit parametry klasického tzv. jednoduchého genetického algoritmu, ale je třeba hledat novou inspiraci v přírodních systémech.

*Tato práce vznikla za podpory projektu ministerstva školství MSM 212300014.*

## LITERATURA

1. Holland J. H.: *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. University of Michigan Press, Ann Arbor 1975.
2. Kubalík J., Lažanský J., v: *Advances in Soft Computing* (John R., Birkenhead R., ed.), str. 9398. Physica-Verlag, Heidelberg 2000.

## 01 ANALYTICKÉ A PREPARATIVNÍ SEPARACE A CHARAKTERIZACE PEPTIDŮ A BÍLKOVIN KAPILÁRNÍMI A PRŮTOKOVÝMI ELEKTROMIGRAČNÍMI METODAMI

VÁCLAV KAŠIČKA, ZDENĚK PRUSÍK,  
PETRA SÁZELOVÁ, JAN JEŽEK, JIŘÍ JIRÁČEK,  
JAN HLAVÁČEK, JIŘÍ VELEK a TOMISLAV BARTH

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

Vysokoučinné kapilární elektromigrační metody, zónová elektroforéza, izotachoforéza a elektrokinetická chromatografie, byly využity pro kvalitativní a kvantitativní nano-piko-analýzu a charakterizaci biologicky aktivních peptidů a bílkovin<sup>1-3</sup>.

Elektroforetická homogenita ionogenních peptidů a bílkovin, např. inzulinu, des-oktapeptid inzulinu, B23-B30-oktapeptidu inzulinu a jejich derivátů a fragmentů, dalarginů, derivátů oxytocinu a vasopressinu, hmyzího oostatického hormonu a pentadekapeptidového fragmentu proteinu G byla testována kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Peptidy byly analyzovány jako kationty v kyselých elektrolytových systémech (0,1 mol.l<sup>-1</sup> kyselina fosforečná, 0,05 mol.l<sup>-1</sup> tris, pH 2,1; 0,5 mol.l<sup>-1</sup> kyselina octová, pH 2,5) nebo jako anionty ve slabě alkalickém základním elektrolytu (0,04 mol.l<sup>-1</sup> tris, 0,04 mol.l<sup>-1</sup> tricine, pH 8,1).

Čistota neinogenních peptidů, tj. peptidů se zablokovanými resp. derivatizovanými ionogenními skupinami, např. Carbetocinu (des-amino derivátu oxytocinu s amidovou skupinou na C-konci) a peptidových a glykopeptidových dendrimerů s acetylovanými aminoskupinami a amidovanými karboxyskupinami byla testována kapilární elektrokinetickou chromatografií (CEKC) s micelární pseudofází anionického surfaktantu, dodecylsulfátu sodného (SDS), 0,05 mol.l<sup>-1</sup> SDS v tris-fosfátovém pufru (0,02 mol.l<sup>-1</sup> tris, 0,005 mol.l<sup>-1</sup> kyselina fosforečná, pH 8,7).

Stupeň čistoty syntetických či z přirozeného materiálu izolovaných peptidů a bílkovin, jejichž standard nebyl k dispozici, byl stanoven jako relativní výška resp. plocha jejich píku.

CZE a CEKC analýzy byly provedeny v kapilárním elektroforetickém analyzátoru vlastní konstrukce vybaveném UV fotometrickým detektorem s pevnou vlnovou délkou 206 nm. Separačním prostorem je křemenná kapilára s vnitřním průměrem 0,05 mm, vnějším průměrem 0,2 mm, celkovou délkou 315 mm a efektivní délkou (od počátku kapiláry k detektoru) 200 mm. Peptidy byly rozpuštěny v základních elektrolytech nebo ve vodě v koncentračním rozsahu 0,3–0,8 mg.ml<sup>-1</sup>. Femtomolová-pikomolová množství peptidů byla analyzována v nanolitrových objemech vzorků zavedených do kapiláry hydrostatickým tlakem vytvořeným rozdílem výšek hladin roztoku vzorku a elektrodového roztoku (výškový rozdíl 50 mm byl aplikován po dobu 10–25 s). Separace byly prováděny při laboratorní teplotě, intenzita elektrického pole v kapiláře se pohybovala v rozmezí 200–400 V.cm<sup>-1</sup>.

Obsah nízkomolekulárních ionogenních příměsí v peptidových preparátech, např. acetátů, trifluoroacetátů a fluoridů vázaných jako protiionty bazických peptidů byl určován kapilární izotachoforézou (CITP), metodou kalibrační křivky.

Takto bylo možno stanovit subnanomolová množství iontů v mikrolitrových objemech vzorku.

Na základě korelace mezi kapilární a kontinuální průtokovou zónovou elektroforézou byly analytické CZE separace převedeny na preparativní proces realizovaný kontinuální průtokovou zónovou elektroforézou (FFZE). Z údajů získaných CZE (migrační časy ionogenních a elektroneutrálních analytů) byly spočteny elektroforetické a elektroosmotické rychlosti v kapiláře a v průtokové komoře a podle nich pak byly stanoveny důležité parametry FFZE, celkové napětí na průtokové komoře a průtoková doba nosného elektrolytu. Pro preparativní separaci bylo využito i optimalizované složení základního elektrolytu vyvinuté v CZE.

FFZE byla využita pro purifikaci některých z výše uvedených peptidů (dalarginů, oktapeptidů inzulinu) s preparativní kapacitou 40–60 mg peptidu za hodinu. Výhodou FFZE je, že pracuje v kontinuálním režimu, separace probíhá v beznosčivém prostředí za mírných podmínek, ve kterých se zachovává biologická aktivita peptidů a ztráty materiálu jsou minimalizovány.

FFZE byla provedena v zařízení vlastní konstrukce s průtokovou komorou o rozměrech 500×500×0,5 mm. Separace nejčastěji probíhala v prostředí 0,5 mol.l<sup>-1</sup> kyseliny octové. Peptidy tak byly získány s acetátovým protiiontem, tj. ve formě přímo použitelné pro biologické testy. Vysoký stupeň čistoty peptidů připravených FFZE byl potvrzen jejich CZE a HPLC analýzou.

*Práce byla podpořena grantem č. 203/96/K128 GA ČR.*

## LITERATURA

1. Kašička V., Prusík Z., v: *Integrovaný výzkum biologicky aktivních peptidů* (Barth T., Tichá M., ed.), str. 28. Karolinum UK, Praha 1998.
2. Kašička V., Prusík Z., Sázelová P., Jiráček J., Barth T.: *J. Chromatogr. A* 796, 211 (1998).
3. Kašička V., v: *Analytical and Preparative Separation Methods of Macromolecules* (Aboul-Enein H. Y., ed.), str. 39. Marcel Dekker Inc., New York 1999.

## 02 IODINATED DERIVATIVES OF L-TYROSINE IMMOBILIZED TO DIVINYLSULFONE ACTIVATED SEPHAROSE: AFFINITY CARRIER FOR THE SEPARATION OF PEPSIN ISOFORMS

HANA ARNOŠTOVÁ<sup>a</sup>, ZDENKA KUČEROVÁ<sup>b</sup>, IVA TIŠLEROVÁ<sup>c</sup>, TOMÁŠ TRNKA<sup>c</sup>, and MARIE TICHÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and <sup>c</sup>Department of Organic Chemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague, <sup>b</sup>Department of Pathophysiology, Charles University, U nemocnice 5, Prague, Czech Republic

The estimation of the pattern of isoforms of aspartate proteases and their zymogens is important from the diagnostic point of view. Changes in the mutual ratios of individual isoforms are characteristic markers for some gastric disea-

ses<sup>1,2</sup>. Methods based on biospecific interactions seem to be the most suitable ones for the separation of the enzyme and its zymogen isoforms. There exists only a limited number of described ligands used for the affinity chromatography of pepsin and its zymogen: (peptide inhibitors, poly-L-lysine, antibodies)<sup>3</sup>. *N*-Acetyl-L-phenylalanyl-L-tyrosine is used as a substrate for the determination of the activity of aspartate proteases. A substitution of L-tyrosine for 3,5-diiodo-L-tyrosine results in a significant increase of the pepsin affinity to this substrate, while the affinity of other aspartate proteinases is not changed.

This phenomenon has been used for the preparation of a specific affinity carrier for the pepsin separation and the possible separation of isoforms of pepsin and its zymogen. Divinyl sulfone activated Sepharose 4B (Ref.<sup>4</sup>) was used for coupling: 3,5-diiodo-L-tyrosine, L-tyrosine, BOC-3, 5-diiodo-L-tyrosine, BOC-L-tyrosine, glycine.

Affinity gel containing coupled L-tyrosine and glycine, as a control experiment, were further iodinated by standard chloramine method. The prepared affinity gels were analyzed by the measurement of UV absorption spectra (absorption maxima in the region from 280 to 290 nm) and by the determination of iodine content. The measurement of NMR spectra of the product of the reaction of divinyl sulfone with 3,5-diiodo-L-tyrosine was used to prove that 3,5-diiodo-L-tyrosine is bound to divinyl sulfone by nitrogen atom. Affinity of porcine pepsin to the immobilized ligands was used to compare the properties of prepared affinity carriers.

Results of affinity chromatography of porcine pepsin on the prepared affinity carriers:

- Pepsin was adsorbed to 3,5-diiodo-L-tyrosine due to the presence of iodine substitution, only 10 percentage of pepsin was bound to L-tyrosine coupled to Sepharose by the same way.
- NMR spectra and experiments with coupling BOC derivatives of L-tyrosine of 3,5-diiodo-L-tyrosine with blocked amino group showed that L-tyrosine and its derivatives are linked to activated Sepharose via amino group.
- Pepsin was separated by affinity chromatography on iodinated L-tyrosine-Sepharose into two active fractions. Results are different from those obtained with 3,5-diiodo-L-tyrosine-Sepharose. This fact suggests that the resulting derivative of iodination of L-tyrosine residue is not homogeneous 3,5-diiodo-L-tyrosine.
- Pepsin is not adsorbed to iodinated glycine-Sepharose indicating the iodination of inert matrix is not the cause of different behavior of pepsin on affinity gels.

*The Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 303/98/1121, supported this work.*

## REFERENCES

- Hallissey M. T., Dun J. A., Fielding. J. W. L.: *Scand. J. Gastroenterol.* 29, 1129 (1994).
- Huang S. C., Miki K., Furihara C., Ichinose M., Shimizu A., Oka H.: *Clin. Chim. Acta* 175, 37 (1988).
- Turková J., in: *Bioaffinity Chromatography, Journal of Chromatography Library*, vol. 55, p. 405. Elsevier, Amsterdam 1993.
- Porath J., Belew M.: *Trends Biotechnol.* 3, 2251 (1987).

## 03 MONITORING OF THE *Eco*KI AND *Eco*R124I TYPE I RESTRICTION – MODIFICATION SYSTEMS BY NON-EQUILIBRIUM pH GRADIENT TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS

HOA THAI NGUYEN, KAMILA KOZÁKOVÁ, JAROSLAV WEISER, LIEM DUY NGUYEN, and MARIE WEISEROVÁ

*Institute of Microbiology CAS, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic*

Classical restriction and modification (R-M) systems provide the host bacteria with immunity to infection by foreign DNA and protect cellular DNA from restriction by methylation of adenosyl and cytosyl residues within the sequence recognised by the restriction enzymes. These enzymes are divided into three groups; type I, II and III. The type I R-M systems are the most complex so far discovered and analyses of the genetic determinant of these systems in natural isolates of *E. coli* revealed unusual allelic diversity<sup>1</sup>.

Type I R-M systems are classified into four distinct families; IA, IB, IC and ID. Most of them are encoded by chromosomally located genes, like *Eco*KI (IA) system. R-M system *Eco*R124I (IC) is a representative of a plasmid-born enzymes. These enzymes are coded by three genes; *hsdR*, *hsdM* and *hsdS*. All three genes are required for production of the restriction endonuclease; *hsdR* is absolutely required for restriction and is transcribed from its own promoter ( $P_{RES}$ ); while *hsdM* and *hsdS* are transcribed from a separate promoter ( $P_{MOD}$ ) and together are required for modification<sup>2,3</sup>.

High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), which was introduced by O'Farrell<sup>4</sup> in 1975 allows to separate up to thousands of proteins according to charge (pI) in the first dimension and size (molecular weight) in the second dimension. This technique has a unique capacity for the resolution of complex mixtures of proteins, permitting simultaneous analysis of thousands of gene products, in their interactive expression levels regulated by certain cellular physiological situations. The only disadvantage of equilibrium isoelectric focusing (IEF) lies in the pH gradient instability in the basic region, which causes the common problem called cathodic drift, in case the running time is prolonged. In addition, basic proteins poorly enter the first dimensional gel even if more basic ampholites are used. This problem was overcome by non-equilibrium pH gradient system (NEPHGE) developed by O'Farrell<sup>5</sup>.

We have developed series of protocols which were optimized for detection of all three subunits of *Eco*KI and *Eco*R124I on one 2-D gel with cell crude extract.

First of all we found that the way of sample preparation is crucial for successful analysis of these proteins. Samples were treated with benzonase in presence of  $Mg^{2+}$  ions. This treatment released the proteins from possible attachment to nucleic acids and helped to give a low background in silver staining.

We had to solve the problem of good separation of low pI proteins (*HsdM* and *HsdR*) and highly basic *HsdS* (pI = 9.6) and at the same time keeping all the proteins in one gel. Our preliminary attempts to broaden the pH range of the classical



IEF system in order to meet the terms described above have failed. The HsdR and HsdM subunits could be caught into the range but we have never been able to get the HsdS subunit that has the highest pI on the same gel. To solve this problem, we have developed a very effective procedure involving NEPHGE with Biorad Mini-protean II.

The running time and voltage were optimized for the first dimension to obtain well shaped protein spots which facilitate subsequent computer aided analysis. Because of the high molecular weight of the subunits, we reduced the concentration of acrylamide down to 8 % in the second dimension. The low concentration used enables the high molecular mass proteins to enter the second dimension gel as well as removes the low molecular weight proteins that cause increased background in computer aided analysis.

For highly sensitive silver stain detection of proteins, we used Rabilloud's method, utilizing a glutaraldehyde fixation, which can detect as low as two nanograms of protein<sup>6</sup>.

The combination of all the conditions described above gives us the unique chance to visualize *EcoKI* and *EcoR124I* systems in their complexity. The primary results confirm that we can easily detect all of the three subunits of both *EcoKI* and *EcoR124I* systems as distinct spots on NEPHGE 2D-PAGE. It will allow us to follow the *in vivo* concentration of the three subunits in defined physiological situations individually and in relation to other proteins. This technique, in concert with computer aided analysis of gel images, followed by testing of the restriction-modification activity, promises to reveal more information about nowadays discussed role of subunit concentration in the regulation of function of *Escherichia coli* type I restriction-modification systems.

*The work was supported in part by grants from the Grant Agency of the Czech Republic Nos. 204/98/0443 and 301/00/1369.*

## REFERENCES

1. Barcus V. A., Titheradge A. J., Murray N. E.: *Genetics* 140, 1187 (1995).
2. Bickle T. A., Krüger D. H.: *Microbiol. Rev.* 57, 434 (1993).
3. Titheradge A. J., Ternent D., Murray N. E.: *Mol. Microbiol.* 22, 37 (1996).
4. O'Farrell P. H.: *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975).
5. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H.: *Cell* 12, 1133 (1977).
6. Rabilloud T.: *Electrophoresis* 13, 429 (1992).

## 04 OPTIMALIZÁCIA PURIFIKÁCIE BAKTERIOCÍNU PRODUKOVANÉHO KMEŇOM *ENTEROCOCCUS FAECIUM* AL41

MÁRIA MAREKOVÁ<sup>a</sup>, ANDREA LAUKOVÁ<sup>b</sup>,  
MORTEN SKAUGEN<sup>c</sup> a INGOLF F. NES<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská republika, <sup>b</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, <sup>c</sup>Laboratory of Microbial Gene Technology NLH, As, Norway

*lógie hospodárskych zvierat SAV, Košice, <sup>c</sup>Laboratory of Microbial Gene Technology NLH, As, Norway*

Bakteriocíny môžeme vo všeobecnosti charakterizovať ako heterogénnu skupinu proteínov s rôznou molekulovou hmotnosťou a biochemickými vlastnosťami. Tieto bakteriálne proteíny môžu mať bakteriostatický alebo bakteriocídny účinok na baktérie rovnakého druhu ale aj na baktérie odlišného druhu a pôvodu<sup>1,2</sup>. Enterokoky tvoria na jednej strane časť normálnej flóry gastrointestinálneho traktu a feces tak u ľudí ako aj u zvierat, no na druhej strane môžu spôsobovať rôzne nozokomiálne infekcie. Mnohé kmene enterokokov sú známe ako producenti bakteriocínov ako bolo popísané v posledných rokoch<sup>3</sup>.

Environmentálny kmeň *Enterococcus faecium* AL41 bol vybraný na základe širokého spektra účinku ako aj vysokej aktivity produkovaného bakteriocínu (10 000 AU.ml<sup>-1</sup>). Ako indikátory sme použili 4 bakteriálne kmene (z 19 testovaných indikátorových kmeňov), ktoré sme používali na kontrolu aktivity produkovaných bakteriocínov počas všetkých purifikačných experimentov. Základom pre dobrú izoláciu z produkčného bakteriálneho kmeňa je zabezpečenie čo najoptimálnejších rastových podmienok pre rast producenta a načasovanie izolácie bakteriocínu odpovedajúce maximálnej produkcii, ktorá závisí nielen na vhodne zvolenom kultivačnom médiu (vo väčšine prípadov tekutom), ale aj od pH a teploty<sup>4</sup>. My sme vychádzali pri purifikácii z 2 1 16 h kultivácie produkčného kmeňa *E. faecium* AL41 v MRS (Difco) médiu pri 37 °C. U väčšiny štúdií týkajúcich sa purifikácie bakteriocínov sa hlavný dôraz kladie na prípravu čistých preparátov, zvýšenie výťažku, skrátenie času purifikácie a zníženie výdavkov spojených s purifikáciou. Vo všeobecnosti purifikačné schémy vychádzajú zo zrážania proteínov zo supernatantu. Zrážané proteíny sú postupne rozpustené vo vhodnom tlmivom roztoku a bakteriocínové molekuly sú separované použitím rôznych deliacich metód zahŕňajúc iónomeniče, FPLC alebo HPLC metódy. Našou snahou bolo optimalizovať purifikáciu produkovaného bakteriocínu a určiť jeho základné charakteristiky. Proteíny boli zrážané prídavkom síranu amónneho, pričom sa aktivita produkovaného bakteriocínu prakticky nezmenila. Iónovymenná chromatografia na kolónach PD10 nevyšla aktivitu izolovaného bakteriocínu, preto bola použitá iba kationovymenná chromatografia na SP sepharose s následnou elúciou roztokmi NaCl o rôznej koncentrácii. Ďalej bol študovaný vplyv pH na adsorbciu a následnú elúciu izolovaného bakteriocínu. Optimálna koncentrácia NaCl je 1 mol.l<sup>-1</sup>, pH 5, podobne, ako pri izolácii enterocínu A z kmeňa *E. faecium* EK13. Po každom purifikačnom kroku bola sledovaná aktivita bakteriocínu, jeho AU.ml<sup>-1</sup>, celková aktivita v jednotkách AU ako aj jeho špecifická aktivita a % výťažku. Bolo zistené, že aktivita izolovaného bakteriocínu sa nemení po 1 h inkubácii pri 60 °C, 80 °C, 30 min pri 100 °C a je stabilný pri 4 °C a -20 °C aj po 1 roku.

Koncentrovaný bakteriocín, získaný použitím optimalizovaného protokolu, bol použitý na ďalšiu purifikáciu metódou FPLC, kde boli monitorované rôzne elučné média, ich rôzne koncentračné gradienty s následnou kontrolou aktivity purifikovaného proteínu, až po ich optimalizáciu. U takto pripraveného bakteriocínu s vysokou aktivitou (>30 000 AU.ml<sup>-1</sup>) bola stanovená relatívna molekulová hmotnosť a aminokyselinové zloženie, na základe ktorého bolo zistené, že bakteriocín produkovaný environmentálnym kmeňom *E. faecium* AL41 je



enterocín P o molekulové hmotnosti  $M_r = 4\ 627\ 994$ , který bol po prvýkrát popísaný Luis Cintas a kol.<sup>5</sup>

*Táto práca vznikla za podpory projektu č. 2/6106/99 grantovej agentúry VEGA.*

## LITERATÚRA

1. Nilsen T., Nes, I. F., Holo H.: *J. Bacteriol.* 180(7), 1848 (1998).
2. Lauková A., Mareková M., Javorský P.: *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 257 (1993).
3. Lauková A., Czikková S.: *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 257 (1998).
4. De Vuyst L., Callewaert R., Crable K.: *Microbiology* 142, 817 (1996).
5. Cintas L. M., Casaus P., Havarstein L. S., Hernandez P. E., Nes I. F.: *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (11), 4321 (1997).

## 05 SEMISYNTETICKÉ ANALOGY LIDSKÉHO INZULINU MODIFIKOVANÉ V C-KONCOVÉ OBLASTI B-ŘETĚZCE

LENKA KLASOVÁ<sup>a</sup>, TOMISLAV BARTH<sup>b</sup>,  
JANA BARTHOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ VELEK<sup>b</sup>,  
VÁCLAV KAŠIČKA<sup>b</sup>, JAN JEŽEK<sup>b</sup>, KAREL HUML<sup>b</sup>,  
ŠTEFAN ZORÁK<sup>c</sup> a JOSEF ŠKARDA<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Praha, <sup>c</sup>Ústav experimentální endokrinologie, SAV, Bratislava, <sup>d</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Praha

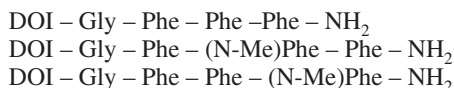
Nové analogy inzulínu pomáhajú objasniť vzťah medzi štruktúrou a funkciou tohto peptidového hormónu. Naše práce smerovala k C-koncové oblasti B reťazce, kde sa nachádzajú v pozíciách B<sup>24</sup>–B<sup>26</sup> aromatické aminokyseliny, dva fenylyalaníny a tyrosín. Táto časť inzulínu je usporiadaná do β-štruktúry a je nevyhnutná pre navázanie na inzulínový receptor. Dôležitosť tejto časti inzulínu pre jeho funkciu bola dokázaná<sup>1,2,3</sup>. Tieto práce študovaly rôzne záměny aminokyselín v pozíciách B<sup>24</sup>, B<sup>25</sup>. My sme sa zaoberali záměnou tyrosínu v pozíci B<sup>26</sup> za fenylyalanín a vplyvom N-methylácie peptidovej väzby v pozíciách B<sup>24</sup>–B<sup>25</sup> a B<sup>25</sup>–B<sup>26</sup>. Používali sme analogy inzulínu zkrátené o poslednú štyri aminokyseliny B<sup>27</sup>–B<sup>30</sup>. Táto sekvencia môže byť z hormónu eliminovaná, aniž by ztratil biologickú aktivitu. Ďalej sme zisťovali vplyv N-methylácie peptidovej väzby na konformáciu molekuly a vplyv na biologickú aktivitu peptidu. Táto modifikácia sa zdá vhodná práve pre objasnenie vzťahu štruktúry a funkcie inzulínu. N-methylácia totiž spôsobí, že sa zmení usporiadanie *trans* na *cis*. Prídáním tejto skupiny sa zväčší objem a tým lze predpokladať, že sa zväčší sterické zábrany, takže sa zmenší rotačná voľnosť základného peptidového reťazca. Vzhľadom k tomu, že je substituovaná metylová skupina, lze predpokladať, že sa zvýši hydrofobnosť tohto úseku. Práve hydrofobnosť tejto časti reťazca je potrebná pre navázanie inzulínu na receptor. Ďalším aspektom N-methylácie peptidovej väzby je, že dusík není schopný tvoriť vodíkovú väzbu.

Všetchny naše analogy byly připraveny enzymovou semisyntézou. Z vepřového inzulínu se trypticky oddělil oktapeptid

za Arg<sup>B22</sup> a vzniklý desoktapeptid(B<sup>23</sup>-B<sup>30</sup>)-inzulín (DOI)<sup>4,5</sup> byl ve změněných reakčních podmínkách, opět trypsinem katalyzovanou reakcí, spojen s tetrapeptidem, připraveným metodou syntézy na pevné fázi.

Jako biologické testy byly využity a) vazba inzulínu na plazmatické membrány tukového tkáně krysy, b) stimulace transportu glukózy na izolovaných kryších adipocytech a c) sledování somatotropní aktivity inkorporací radioaktivního thymidinu do DNA mléčných žláz.

Připravené a testované analogy inzulínu:



Finální výtěžek analogů po enzymové semisyntéze a přečištění pomocí RP-HPLC byl 20–25 % vzhľadom k DOI. Biologická aktivita DOI-GFFF-NH<sub>2</sub> a DOI-GFF(N-Me)F-NH<sub>2</sub> se ve všech sledovaných testech velice blížila biologické potenci inzulínu. Biologická aktivita DOI-GF(N-Me)F-NH<sub>2</sub> byla výrazně nižší než aktivita inzulínu ve všech testech.

Prokázali jsme, že záměna tyrosínu v pozici B<sup>26</sup> inzulínu za fenylyalanín zachovává biologickou aktivitu inzulínu. Ďále bylo dokázáno, že N-methylace väzby mezi Phe<sup>B24</sup>-Phe<sup>B25</sup> vede ke snížení biologické aktivity (glukosový transport, inkorporace – viz výše), což dokazuje důležitost těchto dvou aminokyselinových zbytků pro navázání hormónu na receptor.

## LITERATURA

1. Rieman M. W., Pon L. A., Carpenter F. H.: *Biochemistry* 22, 1507 (1983).
2. Tager H., Thomas N., Assoian R., Rubenstein A., Saekow M., Olefsky J., Kaiser E. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3181 (1980).
3. Mirmira R. G., Tager H.: *J. Biol. Chem.* 264, 6349 (1989).
4. Carpenter F. H., Baum W. E.: *J. Biol. Chem.* 237, 409 (1961).
5. Kubiak T., Cowburn D.: *Int. J. Peptide Protein Res.* 27, 514 (1986).

## 06 CHARACTERIZATION OF THE AMANTADINE – HISTIDINE COMPLEX: UV PRERESONANCE RAMAN SPECTROSCOPY STUDY

JANA STANIČOVÁ<sup>a</sup>, PAVOL MIŠKOVSKÝ<sup>b</sup>,  
and LAURENT CHINSKY<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, University of Veterinary Medicine, Komenského 73, 041 81 Košice, <sup>b</sup>Department of Biophysics, P. J. Šafárik University, Jesenná 5, 041 54 Košice, Slovakia, <sup>c</sup>L. P. B. C. (CNRS URA 2056), Université P. et M. Curie, Case 138, 4 Place Jussieu, 752 31 Paris Cedex 05, France

The interaction of the antiviral and antiparkinsonian drug amantadine with histidine has been studied by UV – pre-resonance Raman spectroscopy in aqueous solution. It was found: i) the formation of the amantadine – histidine complex includes unprotonated amino group of the amantadine; ii) the N1H group of the imidazole ring of histidine is included to the

complex formation; *iii*) the binding acts via a formation of hydrogen bonds between the N1H of histidine and NH<sub>2</sub> group of amantadine.

Amantadine is an antiviral agent that specifically inhibits influenza A virus replication at a micromolar concentration<sup>1</sup>. This drug is also effective in the treatment of human Parkinson's disease<sup>2</sup>. The mechanism of amantadine antiviral activity resides in the blocking of an ion channel capable to modulate the appropriate pH of an environment for a correct virus maturation<sup>1</sup>. An essential histidine residue (His-37) in the transmembrane domain of this channel is believed to play an important role in the amantadine mode of action of influenza A virus. It is suggested that histidine residue forms hydrogen-bonded interactions with the ammonium group of the amantadine<sup>3</sup>. The antiparkinson activity of this drug is less known, although it is also related to the ability of amantadine to block neuromuscular transmission, which may, however, depends on its capacity to increase the synthesis and release of dopamine<sup>2</sup>.

In the paper we present the study of the amantadine (Am) interaction with histidine (His) in aqueous solution with the aim of determining the drug – histidine binding site. The absorption spectra of His and Am shifted to a deep UV region lead us to use the pre-resonance Raman spectroscopy method (excitation 257 nm).

The aqueous solutions of amantadine hydrochloride and histidine were prepared in 0.1 mol.l<sup>-1</sup> concentrations. Their UV-resonance Raman spectra were recorded at pH 3 and pH 7, respectively. The complexes in molar ratio 1:1 and 1:2 were prepared from the stocks solutions.

At acidic pH amantadine hydrochloride remains under the protonated form as the corresponding ammonium form and its resonance Raman spectrum (RRS) is different from that observed at neutral pH when the amino group is unprotonated. The Am-His complex RR-spectrum analyses show that Am is in the protonated form in the complex in spite of fact that pH of complex is neutral. It means that the His interacts with unprotonated amino group of Am and that this interaction leads to the Am amino group protonation. As a results of this type of interaction we can see the ammonium form of Am in the complex. As a consequence of this type of interaction, RRS of the complex 1:2 does not change in relation to the complex 1:1, because only one molecule of His can bound the Am.

On the level of the His molecule an interesting question is – which part of the His molecule is implicated in this interaction. Protonation of the imidazole ring in N3 position produces an expressive changes in RRS of His which are not seen in the complex spectrum. It means that the N3 position does not participate in the complex formation. Vibrational modes of unprotonated His (pH 7) are seen in the complex spectrum. From these findings can be concluded that the formation of the amantadine – histidine complex is realized between the N1H group of histidine and the unprotonated amino group of amantadine via a hydrogen bond formation.

*This work was supported by a grant GAV 1/6027/99 and Slovak – France grant No. 2.*

## REFERENCES

1. Ciampor F., Bayley P. M., Nermut M. V., Hirst E. M. A., Sugrue R. J., Hay A. J.: *Virology* 188, 14 (1992).

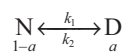
2. Grelak R., Clark R., Stump J. M., Vernier V. G.: *Science* 169, 203 (1999).
3. Gandhi Ch. S., Shuck K., Lear J. D., Dieckmann G. R., DeGrado W. F., Lamb R. A., Pinto L. H.: *J. Biol. Chem.* 9, 5474 (1999).

## 07 CHARAKTERISTIKA TERMODYNAMICKÝCH PRECHODOV PROTEÍNOV POMOCOU TEPLOTNEJ GRADIENTOVEJ GÉLOVEJ ELEKTROFORÉZY

VIKTOR VÍGLASKÝ<sup>a</sup> a MARIÁN ANTALÍK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Moyzesova 11, 041 54 Košice, <sup>b</sup>Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky SAV, Watsonova 47, 043 53 Košice, Slovenská republika

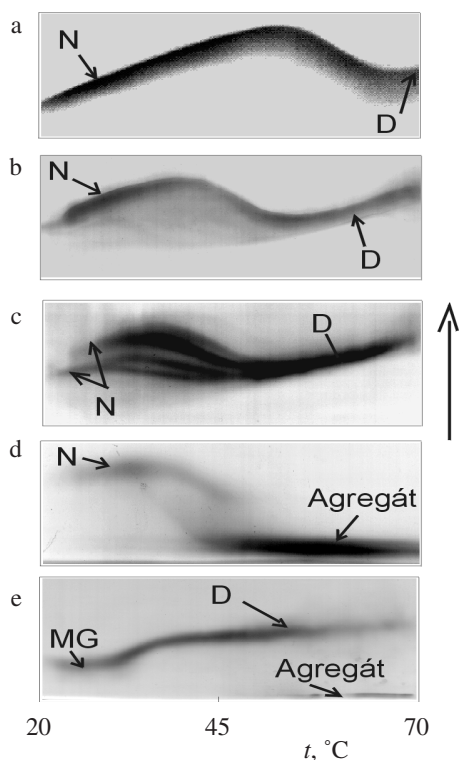
Konformačný stav jednoduchých ale aj zložitejších makromolekúl je determinovaný vonkajšími podmienkami. V podmienkach, v ktorých si makromolekulárny systém zachováva svoju biologickú funkciu pri danej konformácii hovoríme, že systém je v natívnom (N), prípadne v zbalenom (folded) stave. Ak systém v dôsledku zmien vonkajších podmienok (porúch) stráca svoje funkčné vlastnosti, hovoríme o tzv. denaturovanom (D) alebo rozbalenom (unfolded) stave. Denaturovaný systém má tiež určité charakteristické vlastnosti<sup>1</sup>. Veľmi zjednodušene môžeme popísať prechod z natívneho do denaturovaného stavu nasledujúcou schémou:



príčom *a* je frakcia molekúl v denaturovanom stave a *k*<sub>1</sub>, *k*<sub>2</sub> sú rýchlostné konštanty prechodu. Vyhodnotenie prechodu medzi natívnym a denaturovaným stavom sa často komplikuje v reálnych podmienkach experimentu. Medzi úplne denaturovaným a natívnym stavom môžu existovať určité medzistavy, tzv. intermediáty. Na druhej strane, konformačný prechod makromolekúl je často sprevádzaný aj agregáciou monomérnych podjednotiek do celkov s vysokou molekulovou hmotnosťou.

Pomocou teplotnej gradientovej gelovej elektroforézy (TGGE) je možné študovať teplom-indukované konformačné prechody a vďaka separačnej schopnosti sledovať súčasne aj tvorbu ich agregátov. Rôzny stupeň agregácie molekúl je možné pozorovať vďaka deliacej schopnosti elektroforéz. Ak pre separačný čas *t* pri TGGE platí, že *t* >> 1/*k*<sub>1</sub> + 1/*k*<sub>2</sub>, potom v okolí teploty prechodu medzi natívnym a denaturovaným stavom je pozorovateľný kontinuálny spojený nerozmazaný pás a celkový tvar pohyblivosti vzorky od teploty má typický sigmoidálny tvar<sup>2,3</sup>. Tvar sigmoidálnej krivky je závislý aj od kooperativity prechodu. Situácia je odlišná v prípade keď platí, *t* ~ 1/*k*<sub>1</sub> + 1/*k*<sub>2</sub> alebo *t* < 1/*k*<sub>1</sub> + 1/*k*<sub>2</sub>. V tomto prípade je tvar elektroforetického záznamu v okolí teploty prechodu rozmazaný, pretože počas delenia dochádza v okolí teploty prechodu, tj. v blízkosti rovnováhy, nie je striktno definovaný stav molekuly.

Na uvedenom príklade elektroforetických záznamov cytochrómu *c* v rôznych podmienkach (obr. 1) je možné priamo vidieť jednotlivé prípady správania sa proteínu v oblasti kon-



Obr. 1. Elektroforetické záznamy cytochromu c

formačného prechodu. Na elektroforegrame a) vidieť typický sigmoidálny tvar tepelne indukovaného konformačného prechodu z natívneho do denaturovaného stavu v 10 mM acetáte pri pH 3,0, kde  $t \gg 1/k_1 + 1/k_2$ . Na elektroforegrame b) je hodnota pH 2,8. Teplota prechodu sa posúva so znižujúcou sa hodnotou pH k nižším hodnotám. Ďalej je možné na tomto obrázku sledovať okrem najintenzívnejšej frakcie aj náznaky tvorby intermediátov. Na elektroforegrame c) sú pozorovateľné modifikované frakcie cytochrómu c s peroxosíranom sodným. Avšak všetky tieto modifikované frakcie cytochrómu c v 100 mM acetáte pri pH 3,0 od určitej teploty majú rovnakú pohyblivosť, z čoho je možné dedukovať, že všetky formy cytochrómu c majú nerozlišiteľný denaturovaný stav. Na elektroforegrame d) je príklad konformačného prechodu s pomalou kinetikou voči separačnému času,  $t \sim 1/k_1 + 1/k_2$ . Prechod je diskontinuálny a súčasne dochádza k tvorbe agregátov. Čím je vyšší stupeň agregácie, tým menšia je pohyblivosť vzorky v polyakrylamidovom géle. Podmienky v tomto experimente boli 50 mM acetát, 1 mg.ml<sup>-1</sup> kyselina hyaluronová, pH 5,5. Na elektroforegrame e) je možné pozorovať v kyslej oblasti pH 2,0, 100 mM fosfát, pravdepodobne konformačný prechod z molten globulárneho stavu MG do denaturovaného stavu s rýchlou kinetikou a súčasne koexistencia agregátov pri vyšších teplotách s veľmi pomalou kinetikou.

Pri iných typoch proteínov pri istej teplote je možné súčasne detekovať konformačné stavy s rôznym stupňom agregácie, napr. dimerizácia, tetramerizácia, atď.

Táto práca bola financovaná z prostriedkov grantu VEGA č. 1/5053/98.

## LITERATÚRA

1. Creighton T. E.: *Protein Structure a Practical Approach*, str. 225. Oxford Univ. Press, Oxford 1990.
2. Hilser V. J., Worosila G. D., Freire E.: *Anal. Biochem.* 208, 1 (1993).
3. Víglašky V., Antalík M., Bageľova J., Tomori Z., Podhradský D.: *Electrophoresis* 21, 850 (2000).

### 08 INCREASED THERMAL DENATURATION REVERSIBILITY OF PROTEINS IN THE PRESENCE OF POLYANIONS IN ISOELECTRIC pH CONDITIONS

DIANA FEDUNOVÁ<sup>a</sup> and MARIÁN ANTALÍK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics SAS, Watsonova 47, 043 53 Košice, <sup>b</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences UPJŠ, Moyzesova 11, 041 54 Košice, Slovakia

Protein aggregates frequently occur as undesired components in many processes. Aggregation of *de novo* synthesized polypeptide chains decreased yield of the native conformers possessing a biological activity. Similarly, treatment of proteins with stress conditions such as heat denaturation is often accompanied by aggregation of denatured protein molecules. The cells developed special mechanisms for preventing the formation of unfunctional misfolding and aggregates. They contain special proteins, molecular chaperones, which are able to bind partially folded polypeptide chains and facilitate their folding to the native conformation<sup>1</sup> as well as to protect proteins against irreversible aggregates formation under stress conditions<sup>2</sup>. It has been shown that also non – protein polyanionic compounds such as DNA, RNA and heparin together with unnatural polyanion polyvinylsulfate can assist the proper folding of Arc repressor<sup>3</sup> *in vitro*. We have examined possible ability of polyanions polyvinylsulphate (PVS) and polystyrenesulphonate (PSS) to prevent the aggregation of cytochrome c (cyt c) and ribonuclease A (RNase) in the process of heat denaturation near isoelectric pH conditions. The reversibility of thermal denaturation of cyt c and RNase

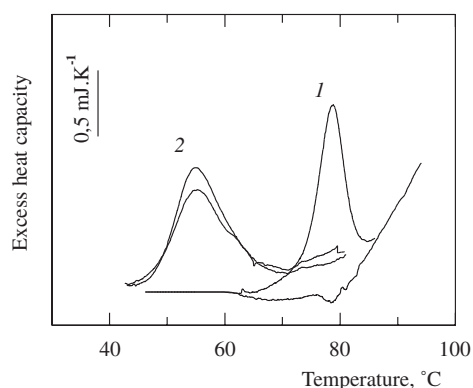


Fig. 1. DSC thermograms of cyt c (1) and cyt c – PVS (2) with curves corresponding to two scans of given sample. 2 μM glycine, 73 μM cyt c and 0.4 mg.ml<sup>-1</sup> PVS

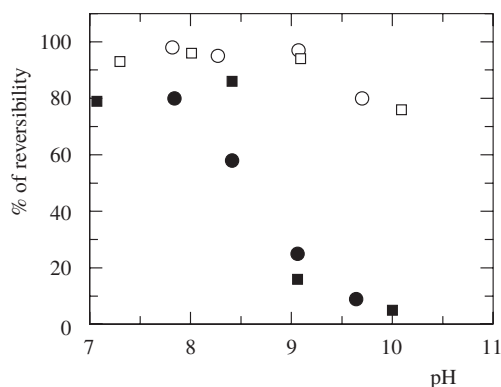


Fig. 2. Plot of % of reversibility of thermal denaturation vs. pH. Cyt c (○), RNase (□●), cyt c – PVS (●), RNase – PVS (■) in 2 mM glycine, prot. conc.  $73 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , PVS –  $0.4 \text{ mg.ml}^{-1}$

in pH 10.0 and 9.6, respectively, is very low (about 5 % of native protein). In the presence of low concentration of PVS the transition characterized by decreased transition temperature and high calorimetric and van't Hoff enthalpy ratio occurs indicating simultaneous binding of several protein molecules to polyanion chain. Increase of PVS concentration to saturation condition has led to the decrease of enthalpy ratio and extensive increase of reversibility to 90 % for both proteins. Protein-polyanion complex is formed on basis of coulombic interaction as is indicated from the loss of complexation at high salt concentration. Although the overall charge of these proteins is neutral, spatially displaced charged groups on the surface of protein molecules forms charged areas responsible for binding with negatively charged groups on polyanion chain. Reduced ability of proteins to form aggregates in complex with PVS probably arises as a consequence of the steric hindrance as well as repulsion of charged groups on polyanion and protein shielding the hydrophobic surfaces responsible for aggregation. The thermal denaturation reversibility of native protein decrease with increase of pH to isoelectric value (Fig. 2). On the other hand, in the complex with polyanion is the high reversibility maintained at all pH studied.

In the case of PSS the high reversible transition has been observed for RNase, but not for cyt c. According to the effect on cyt c structure polyanions has been divided into two groups<sup>4</sup>. In previous work<sup>5</sup> in our laboratory it has been shown that PSS belong to the second group of polyanions possessing stronger effect on structure of heme environment especially due to the hydrophobic interaction participating in complex formation. This stronger effect is manifested by diminish of thermal transition at relatively low concentration of PSS. The high transition reversibility of complex with RNase arises probably due to the content of disulphide bonds stabilizing the structure of protein.

This work was supported by grants of Vega No. 6116 and 7023.

#### REFERENCES

- Martin J., Hartl F. U.: Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 41 (1997).
- Schörder H., Langer T., Hartl F. U., Bukau B.: EMBO J. 12, 4137 (1993).

- Rentzeperis D., Jonsson T., Sauer R. T.: Nature Struct. Biol. 6, 569 (1999).
- Hildebrandt P., Stockburger M.: Biochemistry 28, 6710 (1989).
- Sedlák E., Antalík M.: Biopolymers 46, 145 (1998).

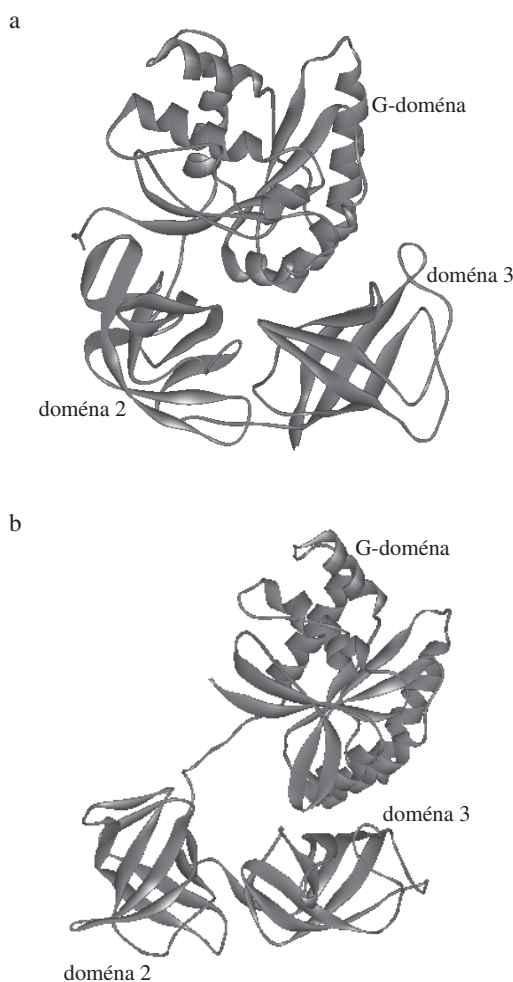
#### 09 TERMOSTABILITA ELONGAČNÍHO FAKTORU Tu Z *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

HANA TOMINCOVÁ, MARKÉTA BRABCOVÁ,  
LIBOR KRÁSNÝ a JIŘÍ JONÁK

Oddělení biosyntézy proteinů, Ústav molekulární genetiky AV  
ČR, Flemingovo n. 2, 166 37 Praha 6

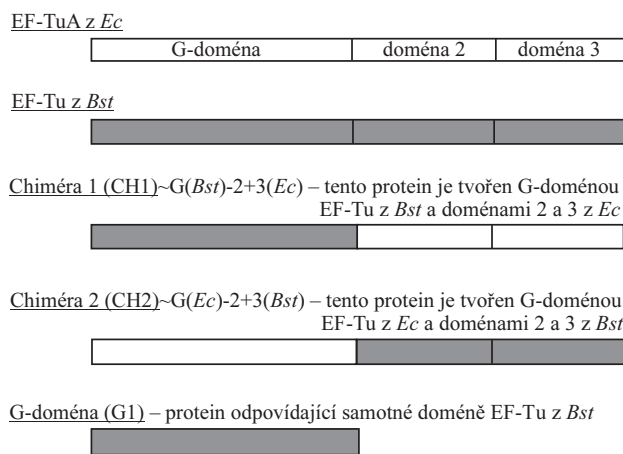
Termostabilita elongačního faktoru Tu (EF-Tu) ze středně termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) byla studována prostřednictvím chimerních proteinů EF-Tu z *Bst* a z mezofilní bakterie *Escherichia coli* (*Ec*).

EF-Tu je nejhojněji se vyskytující protein v bakteriální buňce. Během proteosyntézy přináší do A místa ribozomu



Obr. 1. Struktura EF-Tu z *Thermus aquaticus* v aktivní GTP (a) a neaktivní GDP konformaci (b)





Obr. 2. Složení testovaných proteinů EF-Tu, úseky z *Bst* jsou znázorněny tmavě šedou a úseky *Ec* bílou

molekuly aminoacyl-tRNA při dekodování mRNA. EF-Tu je GTPasa a patří mezi GTP-proteiny. Jejich aktivita je řízena vazbou guaninových nukleotidů, GTP nebo GDP, kdy v závislosti na typu vázaného nukleotidu dochází ke změně konformace proteinu<sup>1,2</sup>. GTP-Proteiny fungují jako molekulární spínače. Bakteriální EF-Tu jsou složeny přibližně ze 400 aminokyselin, které jsou uspořádány do tří domén (obr. 1)<sup>3,4</sup>. G-Doména tvoří polovinu molekuly a svou strukturou představuje typickou G-doménu GTP-proteinů<sup>3</sup> s vazebným místem pro GDP/GTP a GTPasovým centrem.

Byly připraveny dva chimerní proteiny (CH1 a CH2) a samotná G-doména *Bst*. CH1 obsahoval G-doménu z *Bst* a domény 2 a 3 z *Ec*. CH2 byl složen z G-domény *Ec* a domén 2 a 3 z *Bst*. Zároveň byly testovány EF-TuA z *Ec* a EF-Tu z *Bst* (obr. 2). Pro izolaci rekombinantních proteinů byl použit GST purifikační systém. Geny pro tyto proteiny byly připraveny pomocí PCR, vloženy do plazmidu pGEX-5X-3 a produkty exprimovány a izolovány.

Termostabilita proteinů byla testována třemi metodami: *i*) schopností proteinů EF-Tu vázat GDP a *ii*) GTP při vzrůstající teplotě a *iii*) testováním jejich GTPasové aktivity.

Termostabilita GDP i GTP forem proteinů stoupala v tomto pořadí: G-doména *Bst* < EF-TuA *Ec* < CH2 < CH1 < EF-Tu *Bst*. Termostabilita GTP forem byla, až na CH2, o 3–6 °C nižší než GDP forem.

G-Doména *Bst*, ačkoli z termofilního organismu a proteinu, byla sama o sobě velmi termolabilní a nelišila se v tomto smyslu od G-domény EF-TuA z mezofilní *Ec* (cit.<sup>5,6</sup>). Její přínos k termostabilitě se projevil až ve spojení s ostatními dvěma doménami, přičemž příspěvek G-domény k termostabilitě celého proteinu EF-Tu *Bst* byl vyšší než příspěvek domén 2 a 3. Pro to svědčí vyšší termostabilita CH1 vzhledem k CH2.

Z našich experimentů vyplývá, že termostabilita EF-Tu z *Bst* je tedy nejspíše výsledkem vysokého stupně kooperativity mezi G-doménou a zbylými dvěma doménami, vedoucí zřejmě až k synergismu.

Další výzkum bude proto směřovat k charakterizaci povrchových struktur všech tří domén a jejich vzájemných interakcí v rámci celé molekuly EF-Tu.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 204/98/0863.

## LITERATURA

1. Printz M. P., Miller D. L.: Bioch. Biophys. Res. Commun. 53, 149 (1973).
2. Jonák J., Rychlík I.: Biochim. Biophys. Acta 324, 554 (1973).
3. Kjeldgaard M., Nissen P., Thirup S., Nyborg J.: Structure 1, 35 (1993).
4. Berchtold H., Reshetnikova L., Reiser C. O., Schirmer N. K., Sprinzl M., Hilgenfeld, R.: Nature 365, 126 (1993).
5. Parmeggiani A., Swart G. W., Mortensen K. K., Jensen M., Clark B. F., Dente L., Cortese R: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 3141 (1987).
6. Jensen M., Cool R. H., Mortensen K. K., Clark B. F., Parmeggiani A.: Eur. J. Biochem. 182, 247 (1989).

## 10 INTERACTION OF FERRICYT c WITH HETEROPOLYTUNGSTATES

MÁRIA MATOVÁ<sup>a</sup>, MARIÁN ANTALÍK<sup>b</sup>,  
ERIK SEDLÁK<sup>a</sup>, and DUŠAN PODHRADSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Sciences P. J. Šafárik University, Moyzesova 11, 041 54 Košice, <sup>b</sup>Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 043 53 Košice, Slovakia

The study of the complex formation between cyt c and natural partners has a role in understanding the mechanisms of physiological processes connected with this small globular protein, localized in the inner mitochondrial membrane. The interaction between cyt c and natural partner is almost based on coulombic interaction<sup>1,2</sup>. Also is not excluded the participation of another type of forces – noncoulombic, such as

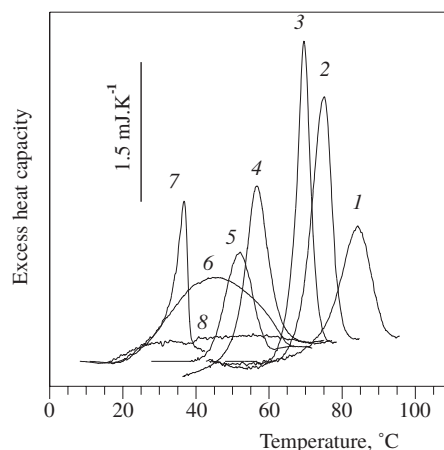


Fig. 1. DSC scans of ferricyt c 1 and ferricyt c-polyanion complex at pH 7.0: ferricyt c-polyglutamate (3 mg polyglutamate, 60 mM phosphate) 2, ferricyt c-heparin (3 mg heparin, 60 mM phosphate) 3, ferricyt c-PVS (3.33 mg PVS, 10 mM phosphate) 4, ferricyt c-SiT (1 mM-SiT, 30 mM phosphate) 5, ferricyt c-HPT (1.75 mM-HPT, 10 mM phosphate) 6, ferricyt c-AsT (1 mM-AsT, 30 mM phosphate) 7, ferricyt c-PSS (3 mg PSS, 60 mM phosphate) 8. The ferricyt c concentration in all samples was 110 μM

hydrophobic interaction, H-bonding<sup>3</sup>. The monitoring of conformational changes of cyt c in complex with natural partners is limited by accessible methods (absorbance spectroscopy, fluorescence spectroscopy, differential scanning calorimetry), because the signals of both physiological partners contribute into measured spectra, respectively thermograms. From this point of view, it seems reasonable to study the ferricyt c properties by using the polyanions as a model of cyt c physiological partners.

Our group focused an attention to study the structural changes of ferricyt c by using linear (hydrophilic) polyanions such as heparin and polyglutamate with good modeling properties<sup>4,5</sup>. Sedlák<sup>3,6</sup> used linear hydrophilic (poly[vinyl-sulfate] (PVS)) and linear hydrophobic (poly[4-styren-sulfate]- (PSS), Nafion]) polyanions to study a degree of perturbation of cyt c structure.

The present work is directed to the investigation of alterations ferricyt c structure by using globular heteropolytungstates as a modeling system of cyt c natural partners. We have selected three polyanions 12-tungstophosphoric acid (HPT),  $[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]^{8-}$  (SiT) and  $[\text{KAs}_4\text{W}_{40}\text{O}_{140}]^{27-}$  (AsT) with Keggin structure. The stability range of these spherically shaped heteropolyanions is approximately restricted to pH 7.0–4.5. The distinct influence of these polyanions on ferricyt c structure may be caused by their different size, negative charge, constitution and stability<sup>7</sup>. The spectroscopic characterization of the complexes ferricyt c-SiT and ferricyt c-AsT have been already demonstrated by Chottard and Hervé<sup>8</sup>. They found out that the binding the ferricyt c to these polyanions is mediated by the participation of coulombic interactions. Our findings were directed to complete these information and make the characterization of complex ferricyt c-HPT, which till now was not extensively studied. In this study were also discussed the complex formations of ferricyt c-heteropolytungstate (HPT, SiT, AsT) in the high ionic strength medium. The results obtained by absorption spectroscopy and differential scanning calorimetry strongly support the participation of noncoulombic forces dealing with the creation of complex ferricyt c-heteropolytungstate. As is evident from Fig. 1, the globular polyanions HPT, SiT and AsT more profoundly affect the global stability of ferricyt c structure as hydrophilic polyanions (polyglutamate, heparin, PVS), where as a binding force is mostly expected the coulombic interaction<sup>4,6</sup>. In the case of the used hydrophobic polyanion PSS was detected the deeper perturbation of ferricyt c tertiary structure in comparison to the influence of globular polyanions HPT, SiT and AsT.

It could be concluded, the polyanions with noncoulombic effect alter the ferricyt c structure stronger than hydrophilic polyanions.

*This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA through Grants No. 4173, No. 5053.*

## REFERENCES

- Osheroff N., Brautigan D. L., Margoliash E.: *J. Biol. Chem.* 255, 8245 (1980).
- Rieder R., Bosshard H. R.: *J. Biol. Chem.* 255, 4732 (1980).
- Sedlák E., Antalík M., Bágelová J., Fedurco M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 258 (1997).
- Bágelová J., Antalík M., Bona M.: *Biochem. J.* 297, 99 (1994).
- Bágelová J., Antalík M., Tomori Z.: *Biochem. Int.* 43, 891 (1997).
- Sedlák E., Antalík M.: *Biopolymers* 1998, 145.
- Pope M. T., ed.: *Heteropoly and Isopoly Oxometalates*. Springer-Verlag, Berlin 1983.
- Chottard G., Michelon M., Hervé M., Hervé G.: *Biochim. Biophys. Acta* 916, 402 (1987).

## 11 STABILIZATION OF SECONDARY STRUCTURE OF CYTOCHROME c BY POLYANIONS

ERIK SEDLÁK<sup>a</sup> and MARIÁN ANTALÍK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, Moyzesova 11, 041 67 Košice, <sup>b</sup>Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 043 53 Košice, Slovakia

Physiological activity of the large majority of proteins is connected with their interactions with other biomacromolecules – proteins, nucleic acids, phospholipid assemblies. Such complexes are usually very complex and the interpreta-

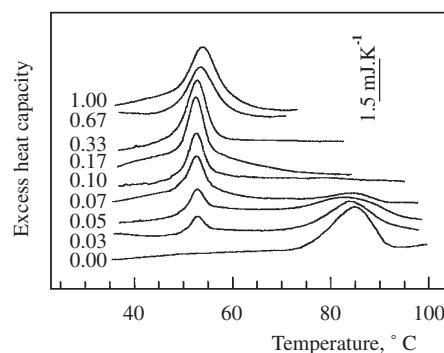


Fig. 1. DSC scans of ferricyt c in 10 mmol.l<sup>-1</sup> phosphate, pH 7.0, on incremental additions of PVS. In all cases, ferricyt c concentrations were 1.0 mg.ml<sup>-1</sup>. PVS concentrations (mg.ml<sup>-1</sup>) are indicated at the curves

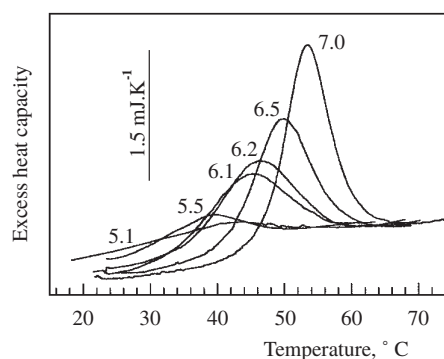


Fig. 2. DSC scans of ferricyt c – PVS in 10 mmol.l<sup>-1</sup> phosphate at pH 6.1, 6.2, 6.5, 7.0, in 10 mmol.l<sup>-1</sup> acetate at pH 5.1 and 5.5. In all cases, ferricyt c and PVS concentrations were 1.0 mg.ml<sup>-1</sup> and 1.0 mg.ml<sup>-1</sup>, respectively

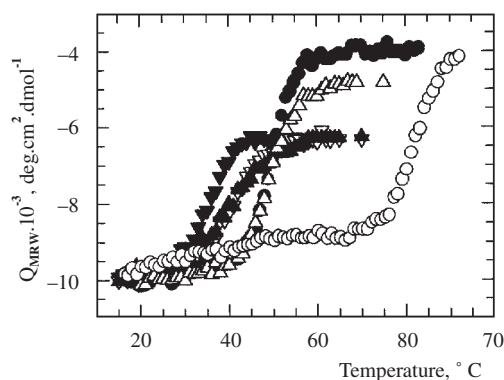


Fig. 3. Thermal unfolding of ferricyt c at pH 7.0 (o) and ferricyt c – PVS complexes measured by CD at 222 nm at different pH: 7.0 (●), 6.2 (Δ), 4.8 (▲), 3.9 (▽) and 2.7 (▼)

tion of results thus obtained is complicated. This is the reason why great effort has been devoted to looking for simple model system mimicking the main properties of substituted biomacromolecule.

Cytochrome c due to its location on the surface of the inner mitochondrial membrane and positive charge ( $pI \sim 10.1$ ) easily interacts both with negatively charged groups of the redox partners and with negatively charged membrane surfaces. The influence of such interactions on ferric cytochrome c (ferricyt c) structure has been intensively studied. In the presented contribution, the effect of polyanion, poly(vinylsulfate) (PVS), used as a model of negatively charged surface, on ferricyt c structure in acidic pH has been studied by circular dichroism (CD) and microcalorimetry (DSC). The polyanion induced only small changes in the native structure of the protein at neutral pH (Ref.<sup>1</sup>), but if profoundly shifted the acid induced high spin state of the heme in the active center of ferricyt c to a more neutral pH region (from pH 2.5 to 5.5)<sup>2</sup>. Although binding of PVS to ferricyt c is connected with significant discontinuous decrease in the melting temperature from 84 °C to 53 °C the protein remained in a compact state (Fig. 1). However, a slight decrease in the pH of the solvent brought about large conformational changes in ferricyt c tertiary structure – indicated by decreased calorimetric enthalpy of the complex thermal transition (Fig. 2) and the changes in its CD spectrum in the Soret and the aromatic regions without affecting ferricyt c secondary structure (Fig. 3) and (Ref.<sup>2</sup>). Ferricyt c in the complex with PVS has thus characteristics typical for molten-globule state. This is especially interesting in light of the previous observations that conformations of various proteins associated with negatively charged membrane surface was affected in the similar way<sup>3,4</sup>. However, till the using of polyanions partially enlightened mechanism of the action of a cooperative assembly of negative charges. Moreover, for the first time we showed that such negative surfaces strongly stabilize the secondary structure of ferricyt c at acidic pH even at increased temperatures (Fig. 3).

*The authors acknowledge the financial support provided by the Slovak Grant Agency VEGA to this research through Grants No. 5053, No. 7023.*

## REFERENCES

1. Sedlák E., Antalík M.: *Biopolymers* 46, 145 (1998).
2. Sedlák E., Antalík M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1434, 347 (1999).
3. de Jongh H. H. J., Killian J. A., de Kruijff B.: *Biochemistry* 31, 1636 (1992).
4. Bañuelos S., Muga A.: *J. Biol. Chem.* 270, 29910 (1995).

## 12 EFFECT OF HEPARIN ON THE LOCAL AND GLOBAL STABILITY OF FERRICYTOCHROME c IN SLIGHTLY ALKALINE pH

ZUZANA GAŽOVÁ, JAROSLAVA BÁGELOVÁ,  
and MARIÁN ANTALÍK

*Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 043 53 Košice, Slovakia*

Cytochrome c (cyt c) is a basic protein, which mediates electron transfer in the respiratory chain of aerobic organisms. During this process, the tight cyt c-redox partner complexes are created through electrostatic interactions<sup>1</sup>. It has been proposed that these interactions involve a cationic patch on cyt c with a bond on cyt c molecule in a dynamic equilibrium of various orientations to the redox partners. The complex formation is accompanied with a conformational rearrangement of both protein molecules near the hemes.

There are some evidence that the pH change at the membrane surface can promote cyt c conformational transition during electron transfer reaction. The alkaline transition of cyt c includes a structural rearrangement of the heme pocket (disruption of the Met80-heme iron bond) leading to a change of the coordination state with an apparent  $pK_a$  of about 9.3. Formation of cyt c-redox partner complexes is followed by a significant increase of the  $pK_a$  constant as well as decrease of the denaturation temperature of cyt c (Ref.<sup>2</sup>).

The artificial polyanions could mimic the negatively electrostatic field of the redox partners. They do not absorb light in the visible region and provide thermodynamic reversibility of the studied processes, so, they serve as a useful models of natural redox partners. Heparin, the flexible “linear” hydrophilic polyanion, generates complexes with cyt c. It has been shown that spectral changes of cyt c occurring after addition of heparin are similar to those of redox partners at neutral pH and physiological temperature<sup>3</sup>.

The effect of saturated solution of heparin on the thermal stability of the Met80-heme iron bond and on the global stability of ferricyt c was studied by absorption spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC) in slightly alkaline pH region (from 7.0 to 9.5). Fig. 1 shows the effect of pH on the midpoint of the thermal transition of cyt c near the heme (spectral data) as well as molecule as a whole (DSC data).

According to spectral data the midtransition temperature of the cleavage of the sulfur-iron bond decreases with increasing pH, while the transition temperature of cyt c complex with heparin does not depend on pH (from 7.0 to 9.5). Similar dependence is observed for denaturation temperature for cyt c, as follows from DSC scans. Addition of saturated amount of

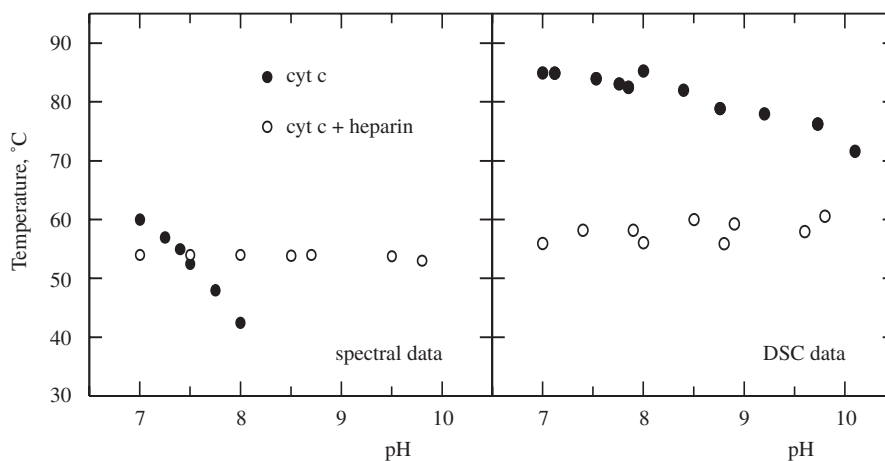


Fig. 1. Dependence of the temperature transition on pH for cyt c (●), and cyt c + heparin (○) (spectral and calorimetric detection). All measurements were performed in 2 mmol.l<sup>-1</sup> phosphate solution, cyt c concentration was 5–7 μmol.l<sup>-1</sup>, 1 mg.ml<sup>-1</sup> of heparin

heparin causes the lowering of the denaturation temperature for cyt c unfolding by 15–25 °C in the observed pH region.

Experimental data shown that heparin stabilizes the Met80-heme iron bond in ferricyt c and decreases the denaturation temperature of the cyt c molecule as a whole. It is evident, that heparin has similar effect as the redox partners on the thermal stability of cyt c (Ref.<sup>4</sup>). So, the conformational changes of cyt c detected in the presence of heparin may have biological implication in understanding the origin of protein conformational changes induced by interactions with its biological redox partners as well as membrane lipids.

This work was supported by research grants from Slovak Grant Agency No. 6116 and 7023.

## REFERENCES

1. Michel B., Bosshard H. R.: J. Biol. Chem. 259, 10085 (1984).
2. Antalík M., Bona M., Bágelová J.: Biochem. Int. 28, 675 (1992).
3. Antalík M., Bona M., Gažová Z., Kuchár A.: Biochim. Biophys. Acta 1100, 155 (1992).
4. Krescheck G. C., Erman J. E.: Biochemistry 27, 2490 (1988).

## 13 A NEW TYPE OF AFFINITY CARRIER FOR THE ISOLATION OF PHOSPHORYLCHOLINE BINDING PROTEINS

JIRÍ LIBERDA<sup>a</sup>, MAREK ŠVESTÁK<sup>a</sup>,  
VĚRA JONÁKOVÁ<sup>b</sup>, and MARIE TICHÁ<sup>a</sup>

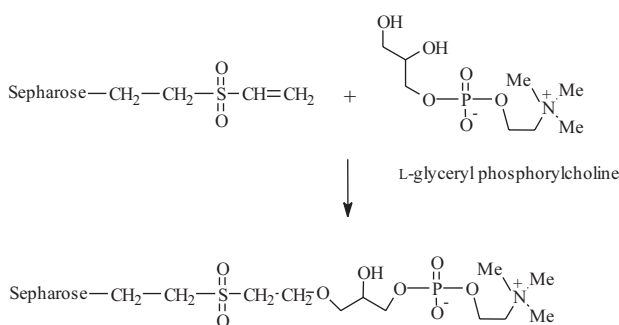
<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague, <sup>b</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague, Czech Republic

A number of different types of phosphorylcholine binding proteins exist that differ in their properties and function.

C-Reactive protein (CRP)<sup>1</sup> frequently used as a clinical index of acute inflammation represents the most studied phosphorylcholine binding protein. CRP is also found in the invertebrate *Limulus polyphemus* as a constitutive and major component of horseshoe crab hemolymph<sup>2</sup>. Another type of proteins possessing the ability to interact with phosphorylcholine was found among proteins of seminal plasma of different species. Some of seminal plasma proteins are known to bind specifically to the sperm surface, in this case, an interaction of surface sperm proteins with phosphorylcholine-containing components of the sperm membrane is involved<sup>3</sup>.

Phosphorylcholine binding activity of some proteins from seminal plasma of different species is used for the isolation of these proteins. Mostly, the combination with affinity chromatography on immobilized heparin was applied: proteins were adsorbed to Heparin-Sepharose and the elution with phosphorylcholine solution followed<sup>4-6</sup>. In some cases direct binding to immobilized *p*-aminophenyl phosphorylcholine to Sepharose was used<sup>7</sup>.

We have prepared a new type of affinity carrier containing immobilized phosphorylcholine: L-glyceryl phosphorylcholine was coupled to divinyl sulphone activated Sepharose (Schema 1). The only used immobilized phosphorylcholine was linked to Sepharose via *p*-amino phenyl spacer arm. Contrary to it, the ligand used in our experiments represents directly a part of phospholipids present in membranes participating in interactions of studied proteins *in vivo*.



Schema 1



The prepared phosphorylcholine derivative coupled to Sepharose was used for the affinity chromatography of phosphorylcholine binding proteins from bull and boar seminal plasma. The adsorbed proteins to the affinity carrier were specifically eluted with the phosphorylcholine solution. No proteins were obtained by following elution with 4 M urea. Mercaptoethanol coupled to divinyl sulphone activated Sepharose (so-called thiophilic gel<sup>8</sup>) was used as a matrix to evaluate the effect of divinyl sulphone derivative that was formed on the protein interaction.

Isolated phosphorylcholine binding proteins were characterized by SDS electrophoresis and HPLC with reversed phase. The composition of the mixture of phosphorylcholine binding proteins obtained using the affinity carrier prepared by us was compared with that isolated by the combination of affinity chromatography on heparin-Sepharose followed by the elution with the phosphorylcholine solution.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 303/99/0357 and by the Ministry of Education of the Czech Republic, grant No. VS 96/141.*

## REFERENCES

1. Ballou S. P., Kushner I.: *Adv. Intern. Med.* 37, 313 (1992).
2. Nguyen N. Z., Suzuki A., Cheng S. M., Zon G., Liu T. Y.: *J. Biol. Chem.* 261, 10450 (1986).
3. Desnoyers, Manjubath P.: *J. Biol. Chem.* 267, 10149 (1992).
4. Calvete J. J., Carrera E., Sanz L., Topfer-Petersen E.: *Hoppe Seylers Biol. Chem.* 377, 521 (1996).
5. Jonáková V., Kraus M., Veselský L., Čechová D., Bezouška K., Tichá M.: *J. Reprod. Fertil.* 114, 25 (1998).
6. Calvete J. J., Mann K., Sanz L., Raida M., Topfer-Petersen E.: *FEBS Lett.* 399, 147 (1996).
7. Calvete J. J., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Topfer-Petersen E.: *FEBS Lett.* 407, 201 (1997).
8. Porath J., Belew M.: *Trends Biotechnol.* 5, 225 (1987).

## 14 CHARACTERIZATION OF AGGREGATED FORMS OF BOAR SEMINAL PLASMA PROTEINS

PAVLA MAŇÁSKOVÁ<sup>a</sup>, PETRA JELÍNKOVÁ<sup>b</sup>,  
MARIE TICHÁ<sup>b</sup>, and VĚRA JONÁKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague,* <sup>b</sup>*Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague, Czech Republic*

Mammalian seminal plasma contains secretory products of the seminal vesicles and other accessory organs that bind to spermatozoa upon ejaculation. These proteins, localized on the sperm surface, take part in sperm capacitation, gamete recognition and binding of sperm to the ovum.

Five protein fractions (I–V) of molecular masses >100, 55, 45, 30, 5–15 kDa, respectively, were obtained by gel filtration chromatography of boar seminal plasma on Sephadex G-75

SF at pH 7.4. RP HPLC analysis and N-terminal sequencing of these protein fractions showed that high molecular weight fractions (I–III) contained mainly AQN, AWN and PSP II spermadhesins and DQH sperm surface protein. AQN, AWN and PSP spermadhesins are proteins with low molecular mass (12–16 kDa)<sup>1</sup>. They belong to the large family of developmentally regulated proteins with the characteristic CUB domain<sup>2</sup> and play an important role in sperm capacitation and in contact of both gametes<sup>1</sup>. DQH sperm surface protein is a member of the large family of cell and matrix adhesion proteins, and its structure is different from the spermadhesins<sup>3</sup>. Fraction IV consisted of the heterodimer PSP I/PSP II only; its binding properties have already been described<sup>4</sup>. Fraction V contained mainly inhibitors of serine proteinases,  $\beta$ -microseminoprotein, AQN 1 spermadhesin and a minor amount of lactoferrin.  $\beta$ -Microseminoprotein is a mucus-associated protein ( $M_r$  10 kDa), it is produced mainly by the prostate and present in an abundant amount in seminal plasma. Its ability to bind to immunoglobulin has been described, and it has been shown to be able to block antibody production against sperm in the male and female reproductive tracts<sup>5</sup>. Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein, it belongs to the transferrin family of 80 kDa. It is a typical product of the mammary gland. Its presence was also located in seminal plasma, where it is secreted by seminal vesicle epithelium and prostate. Its function is not fully understood in fertilization, and lactoferrin may mediate and regulate various components of the immune system<sup>6</sup>.

Aggregated forms and their HPLC-separated components were tested by the ELBA (Enzyme-linked binding assay) method for binding to some acid polysaccharides. Epithelium cells of the female reproductive tract secrete proteoglycans with heparin- and chondroitin sulphate-like glycosaminoglycan side-chains, which stimulate sperm capacitation<sup>7,8</sup>. These proteins on the sperm surface might act as counterparts to polysaccharide moieties of the proteoglycans in the female tract during sperm capacitation. Aggregates of DQH sperm surface protein and AWN spermadhesins as well as their separated proteins interacted strongly with heparin and chondroitin sulphate. PSP II spermadhesin bound to some acidic polysaccharides, while heterodimer PSP I/PSP II (fraction IV) did not show any binding activity.

The same method was used for studies of binding of aggregated and monomeric protein forms to glycoproteins of porcine zona pellucida and to epididymal and ejaculated boar spermatozoa. AWN 1 and its aggregated forms interacted most strongly with glycoproteins of zona pellucida. Aggregates containing AQN, AWN, DQH and PSP spermadhesins (fractions I–IV) and their HPLC-separated components bound to epididymal and ejaculated boar spermatozoa with the same efficiency.

Our results suggest that aggregated forms of proteins (DQH sperm surface protein, AQN, AWN, PSP II spermadhesins) present in seminal plasma under physiological conditions play a role in coating the sperm surface, in sperm capacitation, recognition and primary binding of spermatozoa to zona pellucida of the ovum.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grants No. 303/99/0357 and 524/96/K162, by the Ministry of Education of the Czech Republic, grant No. VS 96 141, and by the Grant of Charles University 12/1998.*

## REFERENCES

1. Solís D., Romero A., Jiménez M., Díaz-Mauriño T., Calvete J. J.: *FEBS Lett.* 431, 273 (1998).
2. Bork P., Beckmann G.: *J. Mol. Biol.* 231, 539 (1993).
3. Jonáková V., Kraus M., Veselský L., Čechová D., Bezouška K., Tichá M.: *J. Reprod. Fert.* 114, 25 (1998).
4. Maňásková P., Mészárosová A., Liberda J., Voburka Z., Tichá M., Jonáková V.: *Folia Biol. (Prague)* 45, 193 (1999).
5. Kamada M., Mori H., Maeda N., Yamamoto S., Kunimi K., Takikawa M., Maegawa M., Aono T., Futaki S., Koide S. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1388, 101 (1998).
6. Sorrentino S., D'Alessandro A. M., Maras B., Di Ciccio L., D'Andrea G., De Prisco R., Bossa F., Libonati M., Oratore A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1430, 103 (1999).
7. Chandonnet L., Roberts K. D., Chapdelaine A., Manjunath P.: *Mol. Reprod. Dev.* 26, 313 (1990).
8. Lane M.-E., Thérien I., Moreau R., Manjunath P.: *Biol. Reprod.* 60, 169 (1999).

### 15 HEPARIN-BINDING PROTEINS FROM BULL SEMINAL PLASMA AND THEIR INTERACTION WITH D-FRUCTOSE

JIŘÍ LIBERDA<sup>a</sup>, MAREK KRAUS<sup>b</sup>,  
MARKÉTA VLASÁKOVÁ<sup>a</sup>, VĚRA JONÁKOVÁ<sup>b</sup>,  
and MARIE TICHÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague, <sup>b</sup>Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague, Czech Republic

Mammalian fertilization is a series of events involving sperm capacitation, gamete recognition and sperm binding to ovum and mediated by specific interactions between molecules located on the surface of both gametes as well as substances surrounding gametes in natural environment<sup>1</sup>. Interactions of the lectin type play an important role in some steps of this process<sup>2,3</sup>. Proteins of seminal plasma interact with the sperm surface<sup>4</sup> and with several substances of different types, including acidic polysaccharides of the heparin type<sup>5</sup>. Heparin induces capacitation of bull sperm *in vitro*<sup>6</sup>; the presence of D-glucose inhibits this process<sup>6</sup>. Moreover, the binding properties of seminal plasma proteins are probably influenced by low molecular weight components of seminal plasma, e.g. monosaccharides. Seminal plasma of different species contains, besides others, also D-fructose<sup>7</sup>. D-Fructose present in seminal plasma is not only a source of energy, but it may participate in some steps of the fertilization process. D-Fructose was found to inhibit human acrosin<sup>5</sup> or to suppress the acrosome reaction of human spermatozoa<sup>9</sup>.

In our experiments using ELBA (Enzyme Linked Binding Assay) and biotinylated polyacrylamide derivative of heparin<sup>10</sup>, we have tested the effect of monosaccharides on the ability of bull sperm and bull seminal plasma proteins to interact with heparin. The heparin-binding activity of bull seminal plasma proteins was inhibited by D-fructose and in

a lesser degree by D-glucose; D-galactose had no effect. The interaction of bull sperm with heparin was not influenced by the presence of monosaccharides.

These results were confirmed by the affinity chromatography of bull seminal plasma proteins on heparin immobilized to polyacrylamide followed by elution with monosaccharides. The amount of proteins eluted with D-fructose was about 8–10 times higher than those eluted with D-glucose. No proteins were eluted with the D-mannose solutions. The remaining heparin-binding proteins were eluted with 3 M-NaCl.

Proteins adsorbed to a heparin-polyacrylamide column and eluted with D-fructose were analyzed by HPLC with reversed phase, SDS electrophoresis and by the determination of N-terminal amino acid sequence. The D-fructose fraction contains several proteins with rel. mol. wt. of 14 000, 17 500, 27 000, 48 500, 56 000. Among proteins of the D-fructose binding fraction, RNAase dimer was identified. Only traces of the main BSP proteins of bull seminal plasma were found. N-terminal amino acid analysis revealed in the D-fructose binding fraction the presence of three other proteins with the N-terminal sequence not corresponding to known proteins:

- a) EVVTTEDQQXGAAEPSEVEX..... (14 000),
- b) AVGXAPPGWX....(48 500),
- c) XAGGSVHSQX.... (17 500).

The obtained results suggest that monosaccharides present in seminal plasma serve not only as energy source but that they could participate in the interaction of seminal plasma proteins with polysaccharides of the glycosaminoglycan type; these interactions are involved in the capacitation process.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 303/99/0357, and by the Ministry of Education of the Czech Republic grant No. S 95/141 and by the Grant Agency of Charles University grant No. 12/198.

## REFERENCES

1. Töpfer-Petersen E.: *Human Reprod. Update* 5, 314 (1999).
2. Tichá M., Kraus M., Čechová D., Jonáková V.: *Folia Biol. (Prague)* 44, 15 (1998).
3. Kraus M., Liberda J., Voburka Z., Tichá M., Jonáková V.: *Clin. Biochem.* 13, 1 (1999).
4. Jonáková V., Kraus M., Veselský L., Čechová D., Bezouška K., Tichá M.: *J. Reprod. Fert.* 114, 25 (1998).
5. Liberda J., Kraus M., Tichá M., Jonáková V.: *Int. J. Biochromatogr.* 3(4), 281 (1997).
6. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., First N. L.: *Biol. Reprod.* 41, 683 (1989).
7. Anderson R. A., Oswald S., Leto S., Zaneveld L. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 241, 509 (1985).
8. Mori K., Daitoh T., Kamada M., Maeda N., Maegawa M., Hirano T., Irahara M., Aono T.: *Hum. Reprod.* 8, 1729 (1993).
9. Tomaszewski L., Konarska L., Janezewski Z., Szarzynska E., Lebiada K., Hryckiewicz L.: *Life Sci.* 50, 181 (1992).
10. Liberda J., Tichá M., Jonáková V.: *Biotechnol. Tech.* 11, 265 (1997).

## 16 CROSS-REACTIVITY OF ANTIBODIES AGAINST BOAR SPERMADHESINS WITH HEPARIN-BINDING PROTEINS FROM HUMAN SEMINAL PLASMA

MAREK KRAUS<sup>a</sup>, MARIE TICHÁ<sup>b</sup>,  
and VĚRA JONÁKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 37 Prague,* <sup>b</sup>*Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague, Czech Republic*

Boar seminal plasma contains different types of proteins such as e.g. spermadhesins that are bound on spermatozoa upon ejaculation. Spermadhesins located on the sperm surface play a role in capacitation, gamete recognition and interaction of spermatozoa with the egg. Proteins closely related to boar spermadhesins were also found in seminal plasma of other species. Spermadhesins belong to a large family of developmentally regulated proteins with characteristic CUB domains<sup>1,2</sup>.

The aim of this work was to find human seminal plasma proteins related to spermadhesins. For their isolation, we used the same method as for boar spermadhesins, which were separated, using their ability to bind heparin<sup>3</sup>. Similarly, heparin-binding proteins were isolated from human seminal plasma by affinity chromatography on Heparin-Sepharose. By RP HPLC, fractions designated as HHB 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9A, 9B, 10 and 11 were separated. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the spectrum of isolated heparin-binding proteins from human seminal plasma was more complicated than that found in boar seminal plasma. The presence of predominant proteins – semenogelin fragments and lactoferrin and its splitting products were detected. We identified the semenogelin fragments by N-terminal amino acid sequencing of HHB 1 and HHB 2 fractions. Semenogelin, the most dominant protein, originates in seminal vesicles. Upon ejaculation, it constitutes a noncovalent complex coagulum that entrappes spermatozoa and thus inhibits their movement<sup>4</sup>. The coagulum is dissolved by cleavage with semenogelin-specific protease 15–20 min after ejaculation<sup>5</sup>. The released spermatozoa move faster than before entrapment. A hypothesis exists that semenogelin fragments could act as activators of motility<sup>6</sup>. The heparin binding ability of semenogelin was described previously<sup>7</sup>. In HHB 8 – HHB 11, lactoferrin and its fragments were found by immunodetection with rabbit antibodies against human milk lactoferrin that cross-reacts with the human seminal plasma form<sup>8</sup>. This finding is in an agreement with results of Lilja et al.<sup>4</sup> However, the ability of lactoferrin and its fragments from human seminal plasma has not been described. The role of lactoferrin in seminal plasma is probably the protection of spermatozoa from bacterial attack<sup>9</sup>.

Immunochemical methods were used to show the presence of proteins in human seminal plasma that are related to boar spermadhesins. Recently prepared rabbit antibodies against spermadhesins AQN 1 (designated according to the first three N-terminal amino acids of the sequence) and Awn 1 (Ref.<sup>10</sup>) were studied for their cross-reactivity with HHB proteins. By means of immunoblotting of electrophoretically separated proteins, rabbit antibody against AQN 1 cross-reacted with three low Mw bands (10.7, 12.6 and 14.8 kDa) of HHB 8. Four

bands (11.2, 11.9, 13.0 and 14.1 kDa) of HHB 9A and HHB 10 cross-reacted with rabbit antibody against Awn 1 boar spermadhesin.

Although the immunoreactions of antibodies against boar spermadhesins with protein components from human seminal plasma were very strong, the corresponding bands were hardly detectable even by silver staining in polyacrylamide gel.

To identify proteins cross-reacting with antibodies against boar spermadhesins, the gel chromatography of heparin-binding proteins on Sephadex G-75 SF was used. To prevent the formation of protein aggregates, the gel chromatography was performed in 2 M urea. The proteins with cross-reactivity against spermadhesins were eluted in high molecular fractions (mol. wt. 60–100 kDa) containing mainly lactoferrin, which is known to interact strongly with several seminal plasma proteins<sup>11</sup>, and it is likely that it interacts with human spermadhesin-related proteins too.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant Nos. 524/96/K162, 303/99/0357), Grant Agency of Charles University (12/1998), Grant of the Ministry of Education of the Czech Republic (VS 96 141).*

## REFERENCES

1. Calvete J. J., Sanz L., Töpfer-Petersen E.: *Ass. Repr. Tech. Androl.* 6, 316 (1994).
2. Bork P., Beckmann G.: *J. Biol. Chem.* 231, 539 (1993).
3. Jonáková V., Kraus M., Veselský L., Čechová D., Bezouška K., Tichá M.: *J. Reprod. Fert.* 114, 25 (1998).
4. Lilja H., Oldbring J., Rannevik G., Laurell C. B.: *J. Clin. Invest.* 80, 281 (1987).
5. Watt K. W. K., Lee P. J., M'Timkulu T., Chan W. P., Loor R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3166 (1986).
6. Lilja H., Abrahamsson P. A., Lundwall A.: *J. Biol. Chem.* 264, 1894 (1989).
7. Malm J., Hellman J., Magnusson H., Laurell C. B., Lilja H.: *Eur. J. Biochem.* 238, 48 (1996).
8. Sorrentino S., D'Alessandro A. M., Maras B., Di Ciccio L., D'Andrea G., De Prisco R., Bossa F., Libonati M., Oratore A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1430, 103 (1999).
9. Arnold R. R., Cole M. F., McGhee J. R.: *Science* 197, 263 (1977).
10. Veselský L., Pěkníková J., Čechová D., Kraus M., Geussová G., Jonáková V.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 42, 187 (1999).
11. Thaler C. J., Vanderpuye O. A., McIntyre J. A., Faulk W. P.: *Biol. Reprod.* 43, 712 (1990).

## 17 THE NATURE AND POSSIBLE ROLE OF SIZE AND CHARGE HETEROGENEITY OF EF-Tu POPULATION IN *STREPTOMYCES*

LIEM DUY NGUYEN, JANA NOVOTNÁ,  
LADISLAVA KALACHOVÁ, and JAROSLAV WEISER

*Institute of Microbiology CAS, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

Protein synthesis elongation factor Tu (EF-Tu) is one of the most abundant proteins found in bacteria. It participates on



the correct positioning of incoming aminoacyl-tRNA on the ribosome during translation<sup>1</sup>. There have been proposed several other functions for EF-Tu beside its role in elongation, such as the role in RNA transcription<sup>2</sup>, that of a structural protein<sup>3</sup> or in the chaperon-like activity<sup>4</sup>. These functions might be regulated also on a post-translational level. The sequence data show that there are, in the structure of *tuf* genes coding for active EF-Tu in prokaryotes, large homologous or identical regions. The degree of identity is even higher within individual genera of bacteria.

In *Streptomyces* the amino acid sequence identity ranges between 92–98 % for five so far sequenced *tuf1* genes. All of the genes give the product of the same length of 397 amino acids. Nevertheless, the comparison of *tuf* gene products from several *Streptomyces* strains on SDS gel, presented in our study, revealed quite significant differences in their apparent size. Besides of this differences we had also detected for some of the factors analysed on 2D electrophoresis gels presence of isoforms of EF-Tu differing in charge. EF-Tu heterogeneity was observed both in purified factors and in cell crude extracts.

In order to get better understanding of the Tu population heterogeneity we had cloned EF-Tu from *Streptomyces aureofaciens* on a pET plasmid and overproduced it with the T7 RNA polymerase system in *E. coli*. Recombinant *Streptomyces* EF-Tu represented there more than 40 % of total cell protein and was stored in inclusion bodies. We had developed a method for purification of *S. aureofaciens* EF-Tu from isolated inclusion bodies based on the ability of the protein to aggregate spontaneously. Purified protein showed similar charge heterogeneity as EF-Tu isolated from mycelium of *S. aureofaciens* and was of the same size. All the isoforms reacted with antibodies against *S. aureofaciens* EF-Tu and also reacted with monoclonal antibodies against phosphoserine and phosphothreonine. The phosphorylation of the protein was studied in *in vitro* and *in vivo* phosphorylation assays.

We had also followed the concentration and the ratio of EF-Tu isoforms during growth of *S. aureofaciens* in liquid and solid media. For that purpose we had developed a technique of liquid medium, which is easy to change during the growth or to supplement it with radioactive label or various additions.

The current experiments are oriented towards the clarification of the nature and position of potential post-translation modifications which might play a significant role in regulation of EF-Tu functions and are possibly causing the charge and size differences between proteins.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic Grant No. 204/098/0443 and Dr. Nguyem D. Liem was supported by a UNESCO fellowship.*

## REFERENCES

1. Krab I. M., Parmeggiani A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1443, 1 (1998).
2. Travers A.: *Nature* 244, 15 (1973).
3. Beck B. D., Arscott P. G., Jacobson A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1250 (1978).
4. Caldas T. D., El Yaagoubi A., Richarme G.: *J. Biol. Chem.* 273, 11478 (1998).

## 18 PROTEIN-PROTEIN RECOGNITION: MODELING OF STREPTOMYCETE RIBONUCLEASES COMPLEXES WITH BARSTAR AND ASSESSMENT OF BINDING ENERGIES

LUBICA URBÁNIKOVÁ, RADOVAN DVORSKÝ,  
and JOZEF ŠEVČÍK

*Ústav molekulárnej biológie SAV, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava*

Understanding of protein-protein recognition mechanism is important in clarifying of many biological processes and is inevitable for practical application as for example drug design. Complexes of ribonucleases with inhibitors are ideal models for studying the subject.

RNase Sa, Sa2 and Sa3 are guanylspecific endoribonucleases produced by *Streptomyces aureofaciens*. Their structures were solved at high resolutions, including atomic for RNase Sa (Ref.<sup>1</sup>). As the enzymes are toxic for the host cells, high level production was allowed only by contemporary expression of the enzyme and barstar genes. Barstar is a specific intracellular inhibitor of barnase, ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens*<sup>2</sup>. It binds to and fully inhibits Sa ribonucleases by a steric blocking of the active site. Dissociation constants of the complexes of Sa ribonucleases with barstar are in order of  $10^{-10}$  to  $10^{-12}$  mol.l.<sup>-1</sup>, which is three to four orders higher than that of barnase-barstar complex<sup>3</sup>. The structure of barnase – barstar complex was solved at 2.6 and 2.0 Å resolution<sup>4,5</sup>. Crystal structure of the complex of RNase Sa with barstar was solved by molecular replacement and refined at 1.7 Å resolution to  $R = 16.2$  % (Ref.<sup>6</sup>). Structure of RNase St, a ribonuclease from *S. erythreus* is similar to Sa structures<sup>7</sup>. RNase Sa residues, which are important in binding to barstar, are conserved also in St. In spite of that it seems that barstar does not inhibit RNase St as the contemporary expression of RNase St and barstar genes does not protect host cells from the toxic effect of the enzyme<sup>3</sup>.

Complexes of Sa2, Sa3 and St ribonucleases with barstar were modeled on the basis of known structures of RNase Sa – barstar and barnase – barstar complexes and expected flexibility of the molecules. The aim was to rationalize the differences in the dissociation constants and to explain why RNase St is not inhibited by barstar. Modeling has not shown any significant differences in intermolecular contacts in the complexes.

It is known that electrostatic interactions play an important role in formation of complexes. Therefore solvent accessible areas of free enzymes and inhibitor molecules and distribution of surface charges were analyzed and association free energy of complexes was calculated. Interaction energies between ribonucleases and barstar, comprising Coulomb and van der Waals forces were calculated using the molecular forcefield<sup>8</sup>. Contribution of solvent to the tightness of the complexes was acquired by analysis of solvent accessible areas and solution of Poisson-Boltzmann equation. It was found that in complex formation there are involved not only recognition sites but also other regions of solvent accessible surfaces of molecules may play an important role.

The results contribute to better understanding of the me-



chanism of recognition and complex formation and are being used to propose mutations of enzymes and inhibitors in order to modify dissociation constants of the complexes and to increase their tightness.

This work was financed by the Howard Hughes Medical Institute grant number 75195-547601 and the Slovak Academy of Sciences grant number 2/1070/96.

## REFERENCES

1. Ševčík J., Dauter Z., Lamzin V. S., Wilson K. S.: *Acta Cryst. D* 52, 327 (1996).
2. Hartley R. W., Rogerson D. L., Smeaton J. R.: *Prep. Biochem.* 2, 229 (1972).
3. Hartley R. W., Both V., Hebert E. J., Homérová D., Jucovič M., Nazarov V., Rybajlák I., Ševčík J.: *Protein Peptide Lett.* 4, 225 (1996).
4. Guillet V., Laphorn A., Hartley R. W., Mauguén Y.: *Structure* 1, 165 (1993).
5. Buckle A. M., Schreiber G., Fersht A. R.: *Biochemistry* 33, 8878 (1994).
6. Ševčík J., Urbáníková L., Dauter Z., Wilson K. S.: *Acta Cryst. D* 54, 954 (1998).
7. Nakamura K. T., Iwahashi K., Yamamoto Y., Iitaka Y., Yoshida N., Mitsui Y.: *Nature* 299, 564 (1982).
8. Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M.: *J. Comput. Chem.* 4, 187 (1983).

## 19 INFLUENCE OF MUTATIONS AND MYRISTYLATION OF MATRIX PROTEIN FROM MASON-PFIZER MONKEY VIRUS ON ITS CONFORMATION IN SOLUTION

MARTIN HASSMAN, MILAN KODÍČEK,  
MARTIN STROHALM, JAN LIPOV, and TOMÁŠ RUML

*Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague, Czech Republic*

Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) is a prototype of type D retrovirus. Their immature capsids assemble in cytoplasm and afterwards they are targeted to the plasma membrane of the host cell where they are released by the process of budding.

Matrix protein of M-PMV is formed by a single polypeptide chain (12 kDa) and represents a substantial component of virus envelope. Its N-terminal glycine is cotranslationally myristylated by enzyme apparatus of host cell. This modification influences crucially the virus morphogenesis; if the myristylation is prevented, the assembly of the virus particle is not completed. Some of point mutations in matrix protein also affect morphogenesis. The three-dimensional structure of only non-myristylated form M-PMV matrix protein has been elucidated up to now<sup>1</sup>.

In this work we have studied influence of myristylation and some point mutations on M-PMV matrix protein in solution; we would like to know whether the possible conformati-

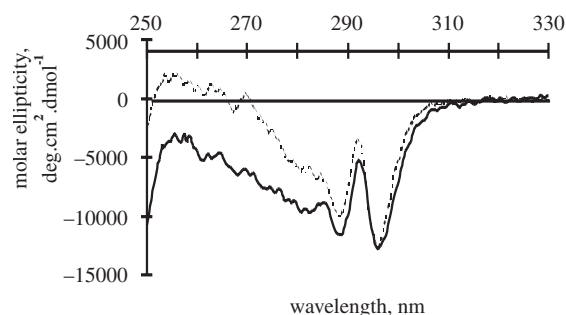


Fig. 1. CD spectrum of matrix protein M-PMV in aromatic region. — myristylated form, --- non-myristylated form

onal changes, induced by these modifications, can be correlated with the changes in morphogenesis of the virus. Using fluorimetry and circular dichroism (CD) spectroscopy we compared three non-myristylated mutants: mutation A18V (Val instead of Ala) prevents transport of preassembled capsid to plasma membrane<sup>2</sup>, R55W (Trp instead of Arg) and R55F (Phe instead of Arg) convert the morphogenesis of M-PMV to the C-type<sup>3,4</sup> (capsid is assembled in direct interaction with the plasma membrane simultaneously with the process of virion budding). Further on, we have compared the myristylated and non-myristylated non-mutated protein; when the protein is not myristylated, the capsid is preassembled in cytoplasm, but not targeted to the membrane.

CD spectra of the studied forms of matrix protein in peptide region were not found to be different; all forms contain about 35 % of  $\alpha$ -helix. On the other hand, CD spectra in aromatic region differ significantly (Fig. 1). As the structure itself of aromatic chromophores is not chiral (inherently achiral chromophores), the observed changes in CD spectra signalise conformational differences on the level of tertiary structure. Of course, with the mutants R55W and R55F the observed changes in CD spectra can be also induced by the presence of another aromatic chromophore.

A broad positive CD band at 260 nm (Fig. 1) is often linked to the presence of disulphide chromophore. The matrix protein contains 2 cystein residues that, according to our experiments, do not react with Ellman reagent. These observations indicate that, at least *in vitro*, the cystein residues are connected by disulphide bridge. This corresponds with the finding that the positive band at 260 nm does not disappear during denaturation by 6 M guanidine hydrochloride; disulphide structure is inherently chiral and, consequently, less sensitive to conformational changes than aromatic bands.

Emission fluorescence spectra (excitation at 295 nm) of all forms of matrix protein studied exhibit maximum at 342 nm. It can be judged that indole residues of Trp are partially buried in hydrophobic core of the protein but they are not completely separated from the contact with water surrounding. Mutation R55W led to an increase and broadening of the emission band to higher wavelength; we can conclude the “additive” Trp is located on the surface of the protein molecule.

The tracing of heat denaturation by both methods has shown that the protein loses its ordered structure at higher temperatures. The denaturation transition is gradual; the native structure does not exhibit a high degree of cooperativity.

*This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 203/00/1005).*

## REFERENCES

1. Conte M. R., Kliková M., Hunter E., Ruml T., Matthews S.: *EMBO J.* 16, 5819 (1997).
2. Rhee S. S., Hunter E.: *EMBO J.* 10, 535 (1991).
3. Rhee S. S., Hunter E.: *Cell* 63, 77 (1990).
4. Yasuda J., Hunter E.: *Virology* 268, 533 (2000).

## 20 ALTERNATIVNÍ SPLICING V AMELOGENESI

RADIM ČERNÝ, MIROSLAV BALVÍN a EVA ČERNÁ

*Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta UK, Karlovarská 48, 301 66 Plzeň*

Amelogenese, tj. tvorba zubní skloviny, je převážně funkcí ameloblastů, speciálně diferencovaných epitheliálních buněk ektodermového původu. Velmi silně mineralizovaná zubní sklovina se původně formuje jako proteinová matrix, která se ukládá paralelně vedle jiné proteinové vrstvy představující budoucí dentin, produkovaný odontoblasty, buňkami mesenchymálního původu. Obě proteinové matrix se výrazně liší typem proteinů, které je tvoří. Zatímco dentin je formován na bázi kolagenu, sklovinu tvoří zvláštní proteiny, které jinde nenajdeme. Jedná se především o amelogenin<sup>1</sup> a dále o tzv. ameloblastin<sup>2</sup>, nazvaný též amelín<sup>3</sup> a sheathlin<sup>4</sup>. Pro amelogenin je typický alternativní splicing, jak bylo zjištěno na modelu myši<sup>5</sup>. Tvoří se tak proteiny o variantních délkách od 59 do 180 aminokyselin.

V naší práci jsem studovali jednak amelogenin morčete, jednak ameloblastin (amelin, sheathlin) morčete a potkana. Ve všech případech jsme zaznamenali variantní mRNA na podkladě alternativního sestříhu. Jednotlivé varianty byly detegovány jako klonované PCR produkty vzniklé syntézou z různých primerů po reverzní transkripci celkové RNA izolované z odontogenní tkáně příslušného druhu. V případě morčete byl analyzován permanentně rostoucí molár dospělého jedince, u potkana šlo o formující se moláry několikadenních mláďat.

Amelogenin morčete je tvořen ze 4 typů mRNA, které kódují proteiny o 65, 187, 212 a 226 aminokyselinách, a to včetně signálního peptidu o 16 aminokyselinách. V jednotlivých klonovaných cDNA jsme zjistili absenci exonu 6b, 6a společně s 6b a konečně současnou absencí exonů 4, 6a a 6b.

Rovněž ameloblastin vykazuje alternativní splicing, i když ne v tak velkém rozsahu jako amelogenin. V případě ameloblastinu potkana nacházíme 2 standardní varianty cDNA lišící se úsekem 45 nukleotidů (15 aminokyselin) v proximální části řetězce (nukleotidy 396–440), což představuje celkovou délku peptidu 422, respektive 407 aminokyselin. Podobné varianty vykazuje i ameloblastin prasete<sup>4</sup>. V případě ameloblastinu morčete se z hlediska zmíněných variant vyskytuje pouze delší forma, ale alternativní splicing jsme zjistili v distálnější části molekuly, a to v rozsahu nukleotidů 782–829, což představuje úsek 16 alternativních aminokyselin, který upravuje celkovou délku molekuly buď na 423 nebo 407 aminokyselin.

Smysl alternativního splicingu je nejspíše ve zvýšení heterogenity proteinových produktů příslušné matrix, aniž je

třeba exprese většího počtu genů. To je dále umocněno řízenou proteolýzou, která postupně mění charakter přítomných peptidů a umožňuje tvorbu potřebných peptidových agregátů, které regulují mineralizaci a celkovou stavbu vznikající skloviny.

*Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ 3735-3.*

## LITERATURA

1. Termine J. D., Belcourt A. B., Christner P. J., Conn K. M., Nysten M. U.: *J. Biol. Chem.* 255, 9760 (1980).
2. Krebsbach P. H., Lee S. K., Matsuki Y., Kozak C. A., Yamada K. M., Yamada Y.: *J. Biol. Chem.* 271, 4431 (1996).
3. Černý R., Slaby I., Hammarström L., Wurtz T.: *J. Bone Min. Res.* 11, 883 (1996).
4. Hu C. C., Fukae M., Uchida T., Qian Q., Zhang C. H., Ryu O. H., Tanabe T., Yamakoshi Y., Murakami C., Dohi N., Shimizu M., Simmer J. P.: *J. Dent. Res.* 76, 648 (1997).
5. Simmer J. P., Hu C. C., Lau E. C., Slavkin H. C., Fincham A. G.: *Calcif. Tissue Int.* 55, 302 (1994).

## 21 VYUŽITÍ PEPTIDOVÉHO MAPOVÁNÍ PROTEINŮ LIDSKÉHO DENTINU PRO STANOVENÍ VĚKU POST MORTEM

ANNA KOTRBOVÁ-KOZAK<sup>a</sup>, ALEXANDER PILIN<sup>b</sup>, JIŘÍ SAJDOK<sup>a</sup> a JAN KÁŠ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav soudního lékařství a toxikologie I. LF UK a VFN v Praze, Studničkova 4, 128 00 Praha 2

V průběhu posledního desetiletí soudní lékařství využívá stanovení racemizace kyseliny asparagové, ke které dochází během stárnutí proteinů s pomalým metabolickým obratem (proteiny zubů, kostí) pro určení věku post mortem<sup>1,2</sup>. Vzhledem k tomu, že sekundární racemizace aspartátu během totální kyselá hydrolyzy při standardní užívané metodě zatěžuje výsledky systematickou chybou, je dnes hledána specifická metoda, která by sekundární racemizaci eliminovala. Byla navržena strategie na využití stafylokokové proteasy V8, o které se předpokládá, že štěpí jak Glu-Xaa, tak Asp-Xaa vazby, ale pouze v místě L-aminokyselinového zbytku. Byla připravena dvojice syntetických substrátů o sekvencích Gly-L-Ser-L-Glu-L-Ala-L-Tyr-Gly-L-Asp-L-Lys-Gly (peptid LELD) a Gly-L-Ser-D-Glu-L-Ala-L-Tyr-Gly-D-Asp-L-Lys-Gly (peptid DEDD). Jelikož nedocházelo ke štěpení peptidu DEDD (peptid LELD štěpen byl), lze usuzovat, že štěpení proteasou V8 je specifické vůči L-aminokyselinám. Byla izolována frakce rozpustných<sup>3</sup> peptidů dentinu (SP) z 25 a 72 letých osob, štěpena proteasou V8 a produkt byl analyzován RP-HPLC. Tímto měla být ověřena použitelnost proteasy V8 pro průkaz přítomnosti D-aspartátu v proteinových štěpech. Ačkoliv rozlišení produktů štěpení nebylo dostatečné, pro kvantitativní vyhodnocení, byly patrné zřetelné rozdíly mezi oběma peptidovými mapami. V současné době je rozpracována optimalizace analytické koncovky metody.

Vzhledem k tomu, že fosfoproteiny a fosfopeptidy tvoří součást organické matrice dentinu, byla vyvinuta technika pro izolaci této skupiny pomocí IMAC s  $\text{Fe}^{3+}$ . Tato nová technika byla aplikována pro sledování změn v obsahu fosfopeptidů<sup>4</sup>.

Je známo, že limitovaná kyselá hydrolyza nevede k výraznému urychlování racemizace aspartátu. Kyselou extrakcí dentinu jsou získány nekolagenní proteiny s vysokým obsahem fosfoproteinů. Zavedení separace fosfoproteinů metodou IMAC od jiných peptidů, získaných kyselou extrakcí, může přinést další vylepšení navrhovaného postupu stanovení D-, L-aspartátu peptidovým mapováním. Pro zvýšení reprodukovatelnosti a snížení nákladů byla proteasa V8 imobilizována.

Práce vznikla s podporou grantu IGA MZ ČR č. 4753-3.

## LITERATURA

1. Othani S., Yamamoto K.: J. Forens. Sci. 36, 792 (1991).
2. Geiger T., Clarke S.: J. Biol. Chem. 262, 785 (1987).
3. Ritz S., Turzynski A., Schutz H. W.: Forensic Sci. Int. 69, 149 (1994).
4. Clarkson B. H., Chang S. R., Holland G. R.: Caries Res. 32, 357 (1998).

## 22 THROMBOGENICITY OF FIBRINOGEN LAYERS

JITKA RYŠAVÁ<sup>a</sup>, JAN E. DYR<sup>a</sup>, JIŘÍ SUTTNAR<sup>a</sup>,  
PETR CIESLAR<sup>b</sup>, EDUARD BRYNDA<sup>c</sup>,  
MILAN HOUSKA<sup>c</sup>, ALBRECHT BRANDENBURG<sup>d</sup>,  
and JIŘÍ HOMOLA<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, U nemocnice 1, 128 20 Prague 2, <sup>b</sup>Charles University, Prague, <sup>c</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, <sup>d</sup>The Fraunhofer Institute of Physical Measurements Techniques, Freiburg, Germany, <sup>e</sup>Institute of Radio Engineering and Electronics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Fibrinogen adsorption to biomaterials plays a key role in their biocompatibility. The conformation of bound fibrinogen determines its reactivity with other proteins including fibrinogen itself and also blood platelets<sup>1</sup>. We used optical methods employing the evanescent light wave penetrating from the surface of an optical element into the adjacent medium for observation of processes taking place in thin films of immobilized fibrinogen. Using specific monoclonal antibodies against various domains of fibrinogen we found that at low fibrinogen surface density the majority of elongated fibrinogen molecules seem to be adsorbed side on, at high surface density the molecules seem to be adsorbed end-on<sup>2</sup>. Different degree of freedom of immobilized fibrinogen depending on its surface density was observed directly by optical sensors. When ionic strength of the medium was lowered, at high fibrinogen density the effective refractive index calculated from the recorded coupling angle decreased due to decrease in the refractive index ( $\Delta N_{\text{eff}}$ ) of solution within the penetration depth of the evanescent wave, but then it increased. At low fibrinogen density and also when a wavelength interrogation-

-based SPR (surface plasmon resonance) sensor was employed the changes were much lower. The theoretical treatment of the grating coupler optics related the decrease in  $\Delta N_{\text{eff}}$  to shrinking of the adsorbed fibrinogen layer. In solution, fibrinogen precipitates when ionic strength is lowered.

Fibrinogen in solution did not bind to surface-bound fibrinogen. Not depending on the hydrophobicity of the surface, a fibrinogen monolayer was always formed. Bound fibrinogen converted by thrombin to fibrin monomer interacted (rather slowly) with fibrinogen in solution. The rate of adsorption depended upon immobilized fibrin monomer density, fibrinogen concentration in solution, and on the presence of calcium ions. At low fibrin monomer density the second layer was formed which contained about the same amount of protein as the first layer, at higher fibrin monomer concentration less than one molecule of fibrinogen per molecule of fibrin monomer was captured.

Supported by the grants No. 102/99/0549 (GAČR) and No. 4642-3, NK/4956-3 (IGA MZd ČR).

## REFERENCES

1. Jiroušková M., Dyr J. E., Suttner J., Holada K., Trnková B.: Thromb. Haemost. 78, 25 (1997).
2. Dyr J. E., Tichý I., Jiroušková M., Tobiška P., Slavík R., Homola J., Brynda E., Houska M., Suttner J.: Sens. Actuators, B 51, 268 (1998).

## 23 STUDIUM REKOMBINANTNÍHO RTX PROTEINU FrpC BAKTERIE NEISSERIA MENINGITIDIS

RADIM OSIČKA<sup>a</sup>, KATEŘINA PROCHÁZKOVÁ<sup>a</sup>,  
SERGEY VATOLIN<sup>a</sup>, JITKA KALMUSOVÁ<sup>b</sup>,  
PAVLA KRÍŽOVÁ<sup>b</sup> a PETER ŠEBO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha,  
<sup>b</sup>Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha

Bakterie *Neisseria meningitidis* je jedním z mikroorganismů způsobujících u člověka bakteriální meningitidu a celkovou sepsi organismu. Tato onemocnění jsou charakterizována tkáňovou a cévní degradací a i přes rychlou a moderní terapii zůstává počet úmrtí na tyto infekce poměrně vysoký. Průběh patogenese onemocnění není na molekulární úrovni prozatím detailně prostudován a navíc, na rozdíl od jiných gramnegativních patogenních bakterií, nebyl u *N. meningitidis* objeven žádný „klasický“ exotoxin, který by se na vzniku či průběhu onemocnění podílel. Nicméně nedávno byly u kmene FAM20 identifikovány dva sekretované proteiny, FrpA a FrpC (cit.<sup>1-3</sup>), podobající se několika charakteristickými strukturálními rysy proteinům patřícím do tzv. RTX (Repeats in ToXin) rodiny cytotoxinů gramnegativních patogenů, které jsou ve většině případů klíčovými faktory virulence. Tato podobnost naznačuje, že proteiny FrpA a FrpC mohou hrát důležitou roli v patogenезi invazivního meningokokového onemocnění.

Pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) byla studována přítomnost *frpA* a *frpC* lokusů kódujících výše uvedené proteiny u téměř sedmdesáti klinických izolátů *N. meningiti-*



dis. Zatímco *frpC* lokus byl detekován u všech kmenů izolovaných z nemocných jedinců a téměř u všech kmenů izolovaných z zdravých kontaktů, *frpA* specifickou DNA se podařilo amplifikovat u méně než poloviny testovaných kmenů. Navíc, devět sekvenovaných *frpC* PCR produktů, identických s počátkem genu *frpC*, vykazovalo vysoký stupeň sekvenční homologie. Z tohoto důvodu byla další část práce zaměřena pouze na *frpC* gen, resp. FrpC protein.

Z genomové DNA jednoho z klinických izolátů *N. meningitidis* byla připravena v plazmidu pTZ19R parciální genomová knihovna a pomocí PCR detekován klon nesoucí *frpC* lokus. Expres FrpC z tohoto lokusu v *E. coli* XL1-Blue vedla k získání pouze velmi nízké koncentrace proteinu. K dosažení vyššího stupně exprese byl gen *frpC* klonován do expresního vektoru pTYB2 (IMPACT T7 System, New England Biolabs<sup>4,5</sup>) pod kontrolu transkripčních a translačních iniciačních signálů genu 10 bakteriofága T7. Výše uvedený systém navíc umožňoval snadnou a rychlou purifikaci proteinu ze surového cytoplazmatického extraktu *E. coli* BL21(DE3) pomocí afinitní chromatografie na chitinové koloně. Jako druhý purifikační krok byla zařazena iontovýmenná chromatografie na DEAE-Sephrose. Výtěžek FrpC proteinu po dvou purifikačních krocích byl 2 mg rozpustného nativního proteinu z 1 litru kultury, jehož čistota byla více než 90 %, jak bylo stanoveno pomocí SDS-PAGE analýzy. Z té bylo navíc zřejmé, že kromě celistvé 198 kDa formy FrpC je na gelu přítomna druhá, asi 150 kDa, forma. Ta byla na Western blotu pomocí specifických monoklonálních protilátek identifikována jako C-koncová část FrpC, přičemž obě formy byly v molárním poměru přibližně 1:1. Dalšími experimenty bylo prokázáno, že obě formy jsou přítomny již v buňce během exprese a navíc, 198 kDa forma vysoce purifikovaného preparátu přechází *in vitro* téměř kompletně na 150 kDa formu v přítomnosti vápenatých iontů, přičemž je možné tento přechod inhibovat přidávkem EDTA. Tyto výsledky naznačují, že jednou z možných aktivit FrpC proteinu je kalcium-dependentní autokatalytické štěpení molekuly.

Purifikovaný protein byl použit jako antigen ke stanovení hladiny anti-FrpC specifických protilátek v sérech pacientů, kteří prodělali invazivní meningokokové onemocnění pomocí metody ELISA. U čtyř pacientů nebyly anti-FrpC specifické IgG protilátky detekovány. U dalších devíti byla detekována hladina protilátek s titrem od 100 do 300. U posledních šesti byla detekována vysoká až velmi vysoká hladina anti-FrpC specifických IgG protilátek, a to s titry od 900 do 72 900. Zvýšené hladiny anti-FrpC specifických IgG protilátek (titr až 900) byly navíc detekovány u některých jedinců, kteří byli v kontaktu s nemocnými, což by mohlo svědčit o možnosti navození imunitní odpovědi prostřednictvím FrpC, aniž by došlo k propuknutí invazivního onemocnění. Tři takové jedince (titr až 300) se nám podařilo identifikovat i mezi zdravou kontrolní skupinou. Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že FrpC protein je jako ostatní RTX proteiny vysoce imunogenní a pokud by se navíc podařilo prokázat baktericidní schopnosti produkovaných protilátek, pak by mohl být i vhodným kandidátem pro novou generaci rekombinantních vakcín.

Za použití FrpC proteinu značeného FLAG epitopem byla pomocí FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) analýzy a imunofluorescenční mikroskopie prokázána vazba proteinu na různé typy eukaryotních buněk pěstovaných ve tkáňové kultuře. Po opracování buněk trypsinem docházelo ke ztrátě

vazby, což ukazuje na interakci FrpC s proteinovým receptorem. U FrpC, na rozdíl od jiných RTX toxinů, nebyla pozorována žádná zjevná cytotoxicita nebo destrukce buněčné membrány (uvolňování laktát dehydrogenasy, MTT redukční test), což naznačuje odlišný charakter působení proteinu na cílové buňky.

## LITERATURA

1. Thompson S. A., Wang L. L., West A., Sparling P. F.: J. Bacteriol. 175, 811 (1993).
2. Thompson S. A., Wang L. L., Sparling P. F.: Mol. Microbiol. 9, 85 (1993).
3. Thompson S. A., Sparling P. F.: Infect. Immun. 61, 2906 (1993).
4. Chong S., Mersha F. B., Comb D. G., Scott M. E., Landry D., Vence L. M., Perler F. B., Benner J., Kucera R. B., Hirvonen C. A., Pelletier J. J., Paulus H., Xu M. Q.: Gene 192, 271 (1997).
5. Chong S., Shao Y., Paulus H., Benner J., Perler F. B., Xu M. Q.: J. Biol. Chem. 271, 22159 (1996).

## 24 STUDIUM MEMBRÁNOVÉ TOPOLOGIE ADENYLÁT-CYKLASOVÉHO TOXINU BAKTERIE *BORDETELLA PERTUSSIS*

JIŘINA LOUCKÁ, RADIM OSIČKA a PETER ŠEBO

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha

Adenylát-cyklasový toxin (ACT) je jedním z klíčových faktorů virulence gramnegativní bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle. ACT obsahuje 1706 aminokyselinových zbytků a skládá se z adenylátcyklasové a hemolytické domény. Adenylátcyklasová doména proniká do cytosolu celé řady buněk, kde po navázání kalmodulinu katalyzuje přeměnu ATP na cAMP<sup>1</sup>. Hemolytická doména je zodpovědná za interakci ACT s cytoplazmatickou membránou cílových buněk a za tvorbu kation selektivních membránových kanálů. Skládá se z několika odlišných oblastí – hydrofóbní domény, oblasti posttranslační modifikace ACT mastnou kyselinou, repetitivní domény vytvářející Ca<sup>2+</sup> vazebná místa a C-koncového sekrečního signálu<sup>1</sup>. ACT je nejenom pozoruhodným příkladem toxinu schopného spontánně pronikat přímo cytoplazmatickou membránou cílových buněk, ale lze jej také použít jako invazivní nereplikativní vektor pro dopravu různých virálních epitopů přímo do cytosolu antigen-prezentujících buněk a následně použít k vakcinačním účelům<sup>2</sup>. Mechanismus interakce ACT s cytoplazmatickou membránou, translokace adenylátcyklasové domény do cytosolu buněk a celková topologie toxinu v membráně ovšem zůstávají neznámy.

Ke studiu topologie ACT v membráně jsme připravili sadu 26 mutantních ACT proteinů, nesoucích v přesně definovaných pozicích epitop FLAG jako intramolekulární marker, který lze detekovat pomocí specifické anti-FLAG monoklonální protilátky. Po zabudování jednotlivých FLAG-ACT do membrány modelových cílových buněk, jsme sledovali přístupnost FLAG epitopu ke štěpení trypsinem přidaným k buňkám. Části s FLAG epitopem zabudovaným v určitém místě ACT, které se nacházely intracelulárně, byly uvnitř erythro-



cytů chráněny proti rozštěpením trypsinem. Ty části toxinu s FLAG epitopem, které zůstaly umístěny extracelulárně a nepronikaly do buněk, byly trypsinem rozštěpeny. Takto získané fragmenty toxinu byly detekovány metodou Western blotu. Fragmenty odpovídající transmembránovým segmentům byly získány po proteolytickém štěpení membrán erythrocytů z extracelulární i z cytosolické strany. Při studiu membránové topologie ACT byla také použita FACS analýza, založená na principu detekce FLAG epitopu za nedenedurujících podmínek. Při interpretaci všech získaných výsledků byl brán v potaz případný částečný pokles biologické aktivity ACT po inzerci FLAG epitopu a vliv umístění epitopu na schopnost monoklonální protilátky specificky rozeznávat FLAG epitop v daném místě molekuly ACT.

Získané výsledky naznačují, že přinejmenším část repetitivní domény ACT proniká rovněž do cytosolu cílových buněk, případně v cytoplasmatické membráně vytváří transmembránové smyčky. Toto tvrzení se opírá zejména o výsledky s konstrukty s epitopem FLAG zabudovaným v pozicích 1334 a 1387, které mají zachovanou původní biologickou aktivitu. Po jejich zabudování do buněčné membrány a štěpení extracelulárně přidaným trypsinem, lze u těchto konstruktů detekovat pomocí Western blotu fragmenty o velikosti 150, 90 a 30 kDa, resp. 80 a 60 kDa, které odpovídají intracelulárním částem toxinu, chráněným před extracelulárním trypsinem. U většiny konstruktů jsme získali hned několik různě velkých chráněných fragmentů, což poukazuje na existenci alespoň dvou konformačních stavů molekul ACT po zabudování do membrány buněk. Výsledky získané s konstrukty s epitopem FLAG v pozicích 510, 524, 594 a 607 ukazují, že hydrofóbní doména ACT rovněž proniká do membrány cílových buněk. Soubor dalších výsledků ukazuje, že adenylát-cyklasová doména proniká do cytosolu buněk, kde dochází k její proteolytické degradaci, a proto její fragmenty bylo možno detekovat pouze po imunoprecipitaci.

Ze získaných výsledků jsme navrhli pracovní model transmembránové topologie ACT.

#### LITERATURA

1. Ladant D., Ullmann A.: Trends Microbiol. 7, 172 (1999).
2. Saron M. F., Fayolle C., Sebo P., Ladant D., Ullmann A., Leclerc C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 3314 (1997).

#### 25 STUDIUM LYTICKÉHO ÚČINKU ADENYLÁT-CYKLASOVÉHO TOXINU BAKTERIE *BORDETELLA PERTUSSIS* NA MODELOVÝCH MEMBRÁNÁCH

JIRÍ MAŠÍN<sup>a</sup>, IVO KONOPÁSEK<sup>a</sup> a PETR ŠEBO<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2, <sup>b</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika

Adenylát-cyklasový toxin (ACT) je klíčovým virulenčním faktorem bakterie *Bordetella pertussis*, která způsobuje onemocnění černý kašel<sup>1</sup>. Jedná se o protein o molekulové hmot-

nosti 177 kDa (1706 aminokyselin), který je tvořen dvěma částmi: adenylát-cyklasou a RTX hemolyzinem.

Hlavní biologickou aktivitou toxinu je jeho schopnost inzerce do membrán různých typů eukaryotních buněk a translokace enzymatické adenylát-cyklasové domény do cytosolu napadené buňky. V cytosolu je adenylát-cyklasa aktivována eukaryotickým kalmodulinem<sup>2</sup> a katalyzuje konverzi ATP na cAMP. Interakci ACT s membránou cílové buňky zabezpečuje druhá část toxinu, tzv. RTX hemolyzin, který vytváří iontové kanály v cytoplasmatické membráně. Pro obě aktivity ACT je nutná posttranslační modifikace mastnou kyselinou a vazba vápenatých iontů. Přesný mechanismus interakce ACT s membránou cílové buňky není znám.

K sledování účinku toxinu na cílovou membránu byla použita metoda měření úniku fluorescenční sondy FITC z lipozomů. Bylo zjištěno, že kinetika úniku fluorescenční sondy působením toxinu je závislá na koncentraci toxinu, koncentraci vápenatých iontů, pH a acylaci toxinu. Získané výsledky naznačují, že při počáteční fázi inzerce ACT do membrány lipozomů dochází nejprve ke vzniku velkých lezí, které umožňují rychlý únik sondy z lipozomů. Ve druhé fázi inzerce pravděpodobně toxin zaujme stabilizovanou definitivní konformaci v membráně a začne účinkovat jako iontově selektivní kanál. To způsobuje pomalejší toky iontů přes membránu vedoucí k pomalejší lyzi lipozomů a ke zpomalení úniku fluorescenční sondy. Vazba a inzerce toxinu do membrány lipozomů nevyžaduje na rozdíl od membrán cílových buněk posttranslační acylaci ACT. Únik fluorescenční sondy z „ghostů“ erythrocytů se vyznačuje odlišnou kinetikou – nebyla zde zaznamenána první „rychlá“ fáze lyze. Mechanismus inzerce toxinu do membrány erythrocytů je tedy patrně odlišný od mechanismu inzerce do membrány lipozomů.

Nastavením membránového potenciálu na lipozomech (cca –30 mV) pomocí koncentračního gradientu KCl(in)/NaCl(out) nedošlo ke zvýšení vazby ACT do membrány (oproti systému bez potenciálu). Také kinetika lyze lipozomů, na kterých byl ustaven potenciál, nejeví oproti systému bez potenciálu žádný rozdíl. Membránový potenciál byl měřen pomocí fluorescenční sondy diS-C<sub>3</sub>(3) (cit.<sup>3</sup>).

*Tato práce byla podporována grantem číslo A5020907 Grantové agentury Akademie věd ČR.*

#### LITERATURA

1. Weiss A. A., Hewlett E. L.: Annu. Rev. Microbiol. 40, 661 (1986).
2. Glaser P., Ladant D., Sezer O., Pichot F., Ullmann A., Danchin A.: Mol. Microbiol. 2, 19 (1988).
3. Večeř J., Heřman P., Holoubek A.: Biochim. Biophys. Acta 1325, 155 (1997).

**26 ACYLATION OF CONSERVED LYSINE 983 IS SUFFICIENT FOR ACTIVITY OF *BORDETELLA* ADENYLATE CYCLASE TOXIN; SUBSTITUTIONS OF ALANINE 140 IN THE ACYLTRANSFERASE CyaC MODULATE THE SELECTION OF TOXIN ACYLATION SITES**

TŮMAY BASAR<sup>a</sup>, VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>a,b</sup>, SILVIA BEZOUŠKOVÁ<sup>a</sup>, LEEANN HIGGINS<sup>b</sup>, MURRAY HACKETT<sup>b</sup>, and PETER ŠEBO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Microbiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*, <sup>b</sup>*Department of Medicinal Chemistry, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA*

The biological activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin (*Bp*-ACT) depends on a posttranslational fatty acylation by the accessory acyltransferase CyaC, which palmitoylates ACT at the conserved lysine 983 (Ref.<sup>1</sup>). However an additional conserved RTX acylation site can be identified in ACT at lysine 860 (K860) and this residue becomes palmitoylated when recombinant ACT (*r-Ec*-ACT) is produced together with CyaC in *Escherichia coli* K12 (Ref.<sup>2</sup>). We have generated a set of mutated CyaC acyltransferases and determined their *in vivo* capacity to acylate the simultaneously produced proACT. Substitutions of the conserved serine 20 and histidine 33 of CyaC ablated its acylating activity, suggesting that Ser20 and His33 residues might be involved in acyl transfer catalysis. In contrast, conservative substitutions of alanine 140 of CyaC by glycine (A140G) and valine (A140V) residues revealed the importance of Ala140 for interaction of CyaC with the two acylation sites on ACT. As assessed by a combination of two-dimensional gel electrophoresis and microcapillary HPLC/tandem mass spectrometric analyses, acylation by the A140V variant of CyaC yielded a close to 1:1 mixture of mono-acylated ACT molecules modified at either the K860, or the K983 residues, respectively. In contrast, acylation by the A140G CyaC variant yielded a close to 1:1 mixture of the non-acylated proACT molecules with mono-acylated ACT palmitoylated exclusively at lysine 983. Both ACT preparations exhibited, however, about 50 % of the biological activity of the doubly acylated ACT, irrespectively of whether half of the ACT preparation consisted of non-acylated proACT, or of the ACT mono-acylated at K860. This strongly suggests, that acylation of lysine 983 is essential and sufficient for biological activity of ACT, while acylation of K860 is dispensable.

*This work was supported by grants No. 310/98/0432 from the Grant Agency of the Czech Republic, No. A5020907 of the Grant Agency of the Academy of Sciences and grants No. VS96149 and ME167 of the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic to P. S.*

REFERENCES

1. Hackett M., Guo L., Shabanowitz J., Hunt D. F., Hewlett E. L.: *Science* 266, 433 (1994).
2. Hackett M., Walker C. B., Guo L., Gray M. C., Van Cuyk S., Ullmann A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Hewlett E. L., P. Sebo.: *J. Biol. Chem.* 270, 20250 (1995).

**27 ANALÝZA ACYLACE ADENYLÁT-CYKLASOVÉHO TOXINU BAKTÉRIE *BORDETELLA PERTUSSIS* (KMEN *BP* 18323/pHSP9) POKROČILÝMI METODAMI HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>a,b</sup>, LEEANN HIGGINS<sup>a</sup>, WEIBIN CHEN<sup>a</sup>, PETR HALADA<sup>b</sup>, PETER ŠEBO<sup>a</sup> a MURRAY HACKETT<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Katedra lékařské chemie, Box 357610, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA*, <sup>b</sup>*Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika*

Adenylát-cyklusový toxin-hemolysin (ACT) je jedním z klíčových faktorů virulence *Bordetella pertussis* (BP), bakterie způsobující černý kašel. Hlavní cytotoxická aktivita tohoto proteinu spočívá v jeho schopnosti pronikat přímo přes cytoplazmatickou membránu některých eukaryotických buněk a dopravovat do jejich cytosolu adenylát-cyklusovou katalytickou doménu. Po spuštění nekontrolované konverze ATP na cyklický AMP pak dojde k narušení základních buněčných funkcí a apoptóze. Adenylát-cyklusový toxin-hemolysin z *B. pertussis* získává svoji biologickou aktivitu až po palmitoylaci ε-aminoskupiny lysinu 983 (K983) pomocí acyltransferasy CyaC. Jako další acylační místo byl v minulosti identifikován lysin 860 (K860), pokud byl rekombinantní ACT produkován v *Escherichia coli*.

Uvádíme detailní hmotnostně-spektrometrickou analýzu acylace ACT, který byl exprimován kmenem *BP* 18323/pHSP9. Jedná se o první případ, kdy palmitoylace byla nalezena na obou lysinech (K860/K983) toxinu, který byl sekretován rekombinantním *BP* kmenem. Současně jsme našli chybu v sekvenci odvozené z DNA (databáze Genbank a Swiss-prot): ve skutečnosti je Val1001 substituován leucinem. Obecný analytický protokol určení polohy acylačních míst v ACT zahrnuje proteolytická štěpení (trypsin, Asp-N, Glu-C, Lys-C) a jejich analýzu metodami mikrokapilární HPLC/MS/MS a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI-TOF).

*Autoři děkují za finanční podporu grantu GA AV ČR č. A5020907 a grantu MŠMT ČR č. ME167.*

**28 STRUKTURA A VLASTNOSTI INHIBITORŮ REZISTENTNÍCH MUTANT PROTEASY VIRU HIV-1 A; POČÍTAČOVÁ STUDIE**

MARTIN LEPŠÍK a JIŘÍ VONDRÁŠEK

*Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6*

Jedním ze způsobů léčby AIDS je použití inhibitorů proteasy viru HIV-1. Problém, který terapii provází, je vznik variant viru, které jsou k danému léčivu rezistentní, protože obsahují tzv. rezistentní mutanty (RM) proteasy. Tyto mutanty váží inhibitor s nižší afinitou, avšak zachovávají si schopnost štěpit přirozený substrát proteasy. Cílem této studie je charakterizovat vybrané inhibitory a klinicky charakterizované rezistentní mutanty proteasy a přispět tak k objasnění mechanismů inhibice a rezistence.

Tabulka I  
Charakteristiky studovaných inhibitorů

Inhibitor	Délka [Å]	Postranní řetězce inhibitoru – vazebné místo proteasy	Vzdálenost karbonylových kyslíků [Å]
AMP	–		–
BMS-182193	14,74		6,08
IDV	16,59	3-methylpyridin-P3, <i>terc</i> -butylamid 2-piperazin karboxylové kys.-P2, P1, benzyl-P1', 2 <i>R</i> -hydroxyindanyl-P2', P3'	4,62
NFV	14,92	2-methyl-3-hydroxybenzoová kys.-P2, <i>S</i> -fenyl Cys-P1, <i>terc</i> -butylamid-dekahydroisochinolin (DIQ)-3-karboxylové kys.-P1', P2'	4,63
QF02	–	Phe, Phe, Gln, Phe	4,82
QF34	–	Phe, Phe, Gln, Phe	4,46
QF37	–	Phe, Phe, Gln, Phe	4,22
QF69	–	Phe, Phe, Gln, Phe	4,22
RTV	17,06	2-isopropyl-4-thiazolymethyl-P3, Val-P2, Phe-P1, Phe-P1', 5-thiazolyl-methylester-P2'	4,49
SKB-3Va	20,24	Ala-P3, Ala-P2, Phe-P1, Gly-P1', Val-P2', Val-psi methyl-P3',	5,56
SQV	15,23	chinolin 2-karboxylová kys.-P3, Asn-P2, Phe-P1, <i>terc</i> -butylamid dekahydroisochinolin-3-karboxylové kys.-P1', P2'	4,92
U89360E	17,53	cyklohexyl Ala-P1, Val-P1', Gln-P2', Arg amid-P3'	4,39

Studie byla prováděna pomocí počítačových metod a s využitím dat z experimentálních prací. Prvním krokem bylo porovnání aminokyselinových sekvencí rezistentních mutant proteasy získaných z provirové DNA léčených pacientů (Weber J., osobní sdělení). Při grafickém znázornění stupně konzervovanosti jednotlivých reziduí se ukázalo, které aminokyselinové zbytky jsou nepostradatelné pro činnost proteasy a které naopak mohou být změněny a příp. různou měrou přispívat k rezistenci.

Byla zkoumána sada inhibitorů – 5 klinicky používaných (saquinavir – SQV, indinavir – IDV, ritonavir – RTV, nelfinavir – NFV a amprenavir – AMP), 4 konstrukty inhibující rezistentní mutanty HIV-1 PR (QF02, QF34, QF37 a QF69) (cit.<sup>1,2</sup>) a 3 inhibitory, u nichž je známa struktura v komplexu s rezistentní mutantou proteasy (BMS-182193, SD146 a U-89360E). Jako referenční byl z databáze proteasových struktur vybrán komplex s inhibitorem SKB-3Va. U všech těchto inhibitorů kromě AMP byly k dispozici krystalové struktury. Studie se zaměřila na charakteristiku následujících vlastností inhibitorů (tab. I): délku řetězce uhlíkatého skeletu, chemické složení postranních řetězců a jejich orientaci ve vazebných místech proteasy (P3-P1, P1'-P3') a vzdálenost karbonylových kyslíků, které jsou v krystalových strukturách přemostěny molekulou vody stabilizující interakci s chloupnými proteasy.

Ačkoli jsou inhibitory strukturálně i chemicky velice rozdílné a liší se mezi sebou charakterem vazby na jednotlivá podmísta proteasy, základní rys vazby – přemostění 2 zbytků proteasy a 2 kyslíků inhibitoru molekulou vody – zůstává zachován.

Jedním z cílů studie bylo charakterizovat konformační flexibilitu vybraných inhibitorů mimo vazebnou dutinu proteasy a přispět tak k objasnění jak samotná struktura a konformační stabilita inhibitoru může ovlivnit jejich afinitu k enzymu. Byly zkoumány 2 sady inhibitorů – struktury získané

vyjmutím z komplexů s proteasou a *de novo* zkonstruované inhibitory. Tyto struktury byly pak podrobeny dvoukrokové energetické minimalizaci programem Discover při použití dvou různých potenciálů CVFF a AMBER. Jedním ze sledovaných parametrů byla vzdálenost dvou karbonylových kyslíků v komplexu vážících molekulu vody. Oba použité potenciály poskytovaly při použití stejného výpočetního protokolu srovnatelné výsledky. Měřená vzdálenost byla oproti vázanému inhibitoru větší. V dalším kroku proto byla k minimalizovaným strukturám přidána molekula vody, orientovaná podobně jako v krystalové struktuře komplexu. Tato změna přispěla ke konvergenci sledovaných parametrů.

Předkládaná práce mapuje roli aminokyselin u proteasy viru HIV-1, udržující určité podstatné strukturální rysy enzymu jejichž mutace mohou způsobovat či přispívat k rezistenci. Studie dále přináší popis konformačních vlastností vybraných inhibitorů HIV-1 proteasy a zabývá se zkoumáním použitelnosti metod molekulární mechaniky na strukturální charakteristiku inhibitorů a jejich vazby.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GA ČR 203/00/0828.

#### LITERATURA

1. Konvalinka J., Litera J., Weber J., Vondrasek J., Hradilek M., Soucek M., Pichova I., Majer P., Strop P., Sedlacek J., Heuser A. M., Kottler H., Krausslich H. G.: Eur. J. Biochem. 250, 559 (1997).
2. Pichova I., Weber J., Litera J., Konvalinka J., Vondrasek J., Soucek M., Strop P., Majer P., Heuser A. M., Krausslich H. G.: Leukemia 11, Suppl. 3, 120 (1997).

## 29 PROTEÍN KINÁZA Cla4 JE POTREBNÁ PRE TVORBU HÝF U *YARROWIA LIPOLYTICA*

ROMAN SZABO

*Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Kvasinkový druh *Yarrowia lipolytica* sa javí vhodnou alternatívou klasických modelových organizmov *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* pre štúdium dimorfizmu ako jedného z najjednoduchších morfológických procesov<sup>1</sup>.

Monomorfický kmeň *Y. lipolytica*, neschopný tvoriť filamenty na pevných médiách ako aj v kvapalných kultúrach, bol pripravený UV mutagénou. Mutantný fenotyp bol recesívny a segregoval po krížení v pomere 2:2, naznačujúc mutáciu v niektorom z jadrových génov. Komplementácia genomickou knižnicou z divého kmeňa viedla k izolácii plazmidovej

DNA, ktorá po transformácii reprodukovateľne obnovovala tvorbu filamentov na úroveň rodičovského kmeňa. Sekvenácia príslušného inzertu odhalila prítomnosť otvoreného čítacieho rámca s dĺžkou 2934 bp, kódujúci polypeptid s 977 aminokyselinami a odhadovanou molekulovou hmotnosťou 106 kDa. Proteín vykazuje najvyššiu homológiu s proteín kinázami Cla4 z organizmov *C. albicans* a *S. cerevisiae*. Podľa predbežných výsledkov sa v genóme študovaného kmeňa *Y. lipolytica* gén pre Cla4 nachádza v jedinej kópii a jeho delécia je pravdepodobne letálna.

*Táto práca bola podporovaná grantami Slovenskej grantovej agentúry VEGA (1/7248/00), Howard Hughes Medical Institute (75195-547301) a grantom Komenského univerzity.*

### LITERATÚRA

1. Herrero A. B., Lopez M. C., Fernandez-Lago L., Dominguez A.: *Microbiology* 145, 2727 (1999).



## 01 THE METABOLISM OF POLYAMINE OXIDATION PRODUCTS IN PLANTS – CHARACTERISATION OF PEA AMINOALDEHYDE DEHYDROGENASE

MAREK ŠEBELA<sup>a</sup>, FRANTIŠEK BRAUNER<sup>a</sup>, ANNA RADOVÁ<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, SUSANNE JACOBSEN<sup>b</sup>, JAN HAVLIŠ<sup>c</sup>, PETR GALUSZKA<sup>a</sup>, and PAVEL PEČ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic,

<sup>b</sup>Department of Biochemistry and Nutrition, Technical University of Denmark, Søtofts Plads, Building 224, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark, <sup>c</sup>Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

Polyamines have been proposed to be the regulatory substances involved in growth, cell division and differentiation<sup>1</sup>. Catabolic regulation of polyamine levels in plant tissues is mediated by Cu-amine oxidases (CAOs) and FAD-polyamine oxidases (PAOs)<sup>1</sup>. Plant CAOs catalyse the oxidative deamination of di- and polyamine substrates, such as putrescine and spermidine, resulting in the formation of 4-aminobutanal (ABAL) and 4-(3-aminopropyl)aminobutanal (APBAL), respectively, along with the release of ammonia and hydrogen peroxide<sup>1,2</sup>. Several plant CAOs have been shown to convert propane-1,3-diamine into 3-aminopropanal (APAL)<sup>3</sup>. The oxidative cleavage of spermidine and spermine by plant PAOs brings about the formation of ABAL and APBAL, respectively, propane-1,3-diamine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ref.<sup>1</sup>). In plants, the above mentioned aminoaldehydes are further metabolised to the respective ω-amino acids by the activity of NAD-dependent aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs). The enzymes have been found in legumes and grasses<sup>4</sup>.

According to our knowledge, we developed first purification protocol enabling isolation of a homogeneous plant AMADH (Ref.<sup>5</sup>). The procedure involved initial precipitations of a pea seedling extract followed by three low pressure chromatographic steps. Partially purified enzyme was further subjected to FPLC on a Mono Q column and to affinity-interaction chromatography on 5'-AMP Sepharose. Native pea AMADH exists as a tetramer of 230 kDa with pI 5.4. The enzyme showed a broad substrate specificity utilising various aminoaldehydes as substrates. The best substrate was APAL, the enzyme also efficiently oxidised ABAL and ω-guanidinoanalogues of the aminoaldehydes. Pea AMADH was inhibited by SH-reagents, several aldehydes and metal-binding agents. Although the enzyme did not oxidise betaine aldehyde at all, the N-terminal amino acid sequence of the enzyme shows a high degree of homology with those of plant betaine aldehyde dehydrogenases<sup>5</sup>.

AMADH was detected in polyacrylamide gels after native electrophoreses by means of an activity staining method with APAL as a substrate, based on the formation of a formazan dye by the reduction of nitroblue tetrazolium<sup>6</sup>. Using the same staining technique, the ultrastructural localisation of AMADH was performed in etiolated pea seedlings. AMADH was detected in intracellular spaces of vascular parenchyma cells in

roots and shoots. At the same developmental stage of the seedlings, copper amine oxidase was localised by a routine staining method<sup>7</sup> in cell walls of rhizodermal and epidermal cells and further in cell walls of vascular parenchyma and xylem cells (in roots and shoots). These results indicate a direct co-operation of the two enzymes in catabolic pathways of polyamines in plants.

*This work was supported by the grant 203/99/D048 of the Grant Agency of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Federico R., Angelini R., in: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants* (Slocum R. D., Flores H. E., ed.), p. 43. CRC Press, Boca Raton 1991.
2. Smith T. A., Croker S. J., Loeffler R. S. T.: *Phytochemistry* 25, 683 (1986).
3. Awal H. M. A., Hirasawa E.: *Phytochemistry* 39, 489 (1995).
4. Flores H. E., Filner P.: *Plant Growth Reg.* 3, 277 (1985).
5. Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P.: *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
6. Weigel P., Weretilnyk E. A., Hanson A. D.: *Plant Physiol.* 82, 753 (1986).
7. Angelini R., Federico R.: *J. Plant Physiol.* 135, 212 (1989).

## 02 ENDOGENOUS INHIBITOR OF AMINE OXIDASE FROM THE SEEDLINGS OF *PHASEOLUS VULGARIS*

MAREK PETŘIVALSKÝ<sup>a</sup>, IVO FRÉBORT<sup>a</sup>, LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, KAREL LEMR<sup>b</sup>, LUDMILA ZAJONCOVÁ<sup>a</sup>, and PAVEL PEČ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, Palacký university, Tr. Svobody 8, 779 00 Olomouc, Czech Republic

Copper amine oxidase (Cu-AO, amine:O<sub>2</sub> oxidoreductase) is the key enzyme in the catabolism of biogenic amines. Cu-AO catalyses the oxidative deamination of amines to corresponding aldehydes. Although its physiological role has not been clearly elucidated, Cu-AO participates in vital processes including cell growth, proliferation and tissue differentiation<sup>1</sup>. Plant Cu-AOs are tightly involved in the lignification of cell wall during normal development and as a part of the defense mechanism during pathogenesis<sup>2</sup>. Due to its relation to some pathological phenomena in mammalian tissues, a special attention is being paid to investigations on species and tissue specific inhibitors of Cu-AO (Ref.<sup>3</sup>).

Cu-AO is inhibited by a variety of diverse natural or synthetic substances<sup>4</sup> but any endogenous inhibitor of Cu-AO regulating its activity *in vivo* has been unambiguously characterized. Hypothetical low- and high-molecular natural inhibi-

tors of Cu-AO were reported in *Arachis hypogea*<sup>5</sup> and *Sorghum vulgare*<sup>6</sup>, but their chemical nature remains unknown. We showed cytokinins are weak inhibitors of plant Cu-AO but unlikely play a physiological role in the regulation of Cu-AO activity<sup>7</sup>. Recently we focused on rather unexpected phenomena in the seedlings of *Phaseolus vulgaris* that do not show significant Cu-AO activity in plant extract. Although the restoration of Cu-AO during its purification after the hydroxyapatite column step indicates the presence of reversible low-molecular inhibitor, the authors of the first report on Cu-AO from *P. vulgaris* discarded this explanation<sup>8</sup>.

In our previous studies, we confirmed Cu-AO from etiolated seedling of white bean (*P. vulgaris*) to be inhibited by a naturally occurring low-molecular endogenous inhibitor, which showed the inhibition also towards Cu-AOs from other *Fabaceae* plants<sup>9</sup>. To enable a detailed chemical and enzymological characterization of the inhibitor, we designed a bioassay-directed fractionation scheme of the seedling extract on the preparative scale. The plant material was extracted, delipidized and deproteinized by non-polar organic solvents and then fractionated by extraction with ethyl acetate, *n*-butanol and water. Fractions exhibiting the inhibitory activity were pooled, vacuum evaporated and subjected to several steps of Si-gel flash column chromatography with chloroform/methanol/water mixtures as eluting phases. Active fraction was further purified by high-pressure liquid chromatography on semi-preparative reversed-phase C<sub>18</sub> and NH<sub>2</sub> columns using UV-diode array detector. The purity of HPLC fractions was checked by thin layer chromatography. The purified substance was characterized as a reversible non-competitive inhibitor of Cu-AO from *P. vulgaris*, *Pisum sativum* and *Lathyrus sativus*. Further elucidation of the inhibitor molecular structure is in progress.

*This research was supported by Ministry of Education, Youth and Physical Education, Czech Republic through Research Intents Grant MSM 153100010 and by University of Palacky Olomouc through Intern Grant Program 2000/2001.*

## REFERENCES

1. Šebela M., Frébort I., Peč P., in: *Advances in Regulation of Plant Growth and Development* (Strnad M., Peč P., Beck E., ed.), p. 23. Peres Publishers, Prague 1999.
2. Rea G., Laurenzi M., Tranquilli E., D'Ovidio R., Federico R., Angelini R.: *FEBS Lett.* 437, 177 (1998).
3. Ercolini L., Angelini R., Federico R., Rea G., Venturini G.: *J. Enz. Inhib.* 13, 465 (1998).
4. Padiglia A., Medda R., Pedersen J. Z., Lorrain A., Peč P., Frébort I., Floris G.: *J. Enz. Inhib.* 13, 311 (1998).
5. Sindhu R. K., Desai H. V.: *Phytochemistry* 19, 317 (1980).
6. Joshi B. H., Prakash V.: *Experientia* 38, 315 (1982).
7. Galuzska P., Šebela M., Luhová L., Zajoncová L., Frébort I., Strnad M., Peč P.: *J. Enz. Inhib.* 13, 457 (1998).
8. Cogoni A., Farci R., Medda R., Rinaldi A., Floris G.: *Prep. Biochem.* 19, 95 (1989).
9. Frébort I., Luhová L., Lemr K., Zajoncová L., Peč P.: *8th Days of Plant Physiology, Olomouc, July 7–10, 1998*; Book of abstracts p. 70.

## 03 ENZYMOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERISATIONS OF POLYAMINE OXIDASES IN PLANTS OF THE GENUS AVENA

ANNA RADOVÁ<sup>a</sup>, MAREK ŠEBELA<sup>a</sup>,  
LUDMILA ZAJONCOVÁ<sup>a</sup>, SUSANNE JACOBSEN<sup>b</sup>,  
and PAVEL PEČ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic,*

<sup>b</sup>*Department of Biochemistry and Nutrition, Technical University of Denmark, Søtofts Plads Building 224, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark*

The polyamines spermidine and spermine and the related diamines putrescine and cadaverine have been shown to play an important role in processes of cell growth, division and differentiation. Enzymes concerned with catabolism of these substances are widespread in living organisms and they have been studied particularly in plants<sup>1</sup>. Plant polyamine oxidases (PAOs) preferentially cleave the aminopropyl side chains at secondary amino groups of spermidine and spermine, producing hydrogen peroxide, propane-1,3-diamine and 1-pyrroline or 1-(3-aminopropyl)-pyrroline, respectively<sup>2</sup>. Plant PAOs are mostly distributed in the monocotyledonous, especially in cereals belonging to the Graminae<sup>2</sup>. Plant polyamine oxidases are usually localised in cell wall similarly as copper amine oxidases. PAO activity staining is most intense in the middle lamellar region of the wall and cells of tissues, where lignification, suberisation and wall stiffening occur<sup>3</sup>. Therefore it could provide hydrogen peroxide for peroxidase mediated crosslinking reactions in the cell wall and may play important role in the regulation of plant growth. Moreover, the products of polyamine oxidation can be effective in the pathogens attack prevention<sup>4</sup>.

Polyamine oxidase (OPAO) was isolated from 14-day-old etiolated seedlings of oat (*Avena sativa*) by a novel purification procedure. Oat seedlings were homogenized and the extract was precipitated with protamine and ammonium sulphates. The crude enzyme was further purified by the application of low pressure chromatography techniques followed with two FPLC steps. Specific activity of the pure enzyme was 2265 nkat.mg<sup>-1</sup> measured with spermidine as a substrate. SDS-PAGE confirmed homogeneity of the final enzyme preparation. Some molecular and kinetic properties of homogenous OPAO were examined. Determination of the molecular mass by SDS-PAGE showed a single protein band of 58 kDa. Oat PAO is an acidic protein with pI 4.7 as determined by chromatofocusing. The purified yellow-coloured enzyme shows visible absorption maxima at 380 and 450 nm. The N-terminal amino acid sequence of oat PAO reveals a high degree of similarity to those of maize PAO and several other flavoprotein oxidases.

Homogenous OPAO was used for the preparation of anti-OPAO antiserum by the immunisation of a White New Zealand rabbit. After bleeding the rabbit, the serum was tested for the presence of anti-OPAO polyclonal antibodies by the Ouchterlony's double diffusion test<sup>5</sup>. The antibody prepared was found to cross-react with PAOs of barley and millet seedlings. A certain degree of cross-reactivity was demonstra-

ted to be related to glycan epitopes by deglycosylation treatments and could be overcome by affinity chromatography procedures<sup>6</sup>.

Some characteristics of PAOs from wild oat plants (e.g. *A. barbata*, *A. abyssinica*) were compared with those of OPAO using electrophoretic methods (native PAGE, SDS PAGE, isoelectric focusing), immunodiffusion tests and the Western blotting technique and found to be very similar.

#### REFERENCES

1. Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J.: *Plant Sci.* 140, 103 (1999).
2. Federico R., Angelini R., in: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants* (Slocum R. D., Flores H. E., ed.), p. 41. CRC Press, Boca Raton 1991.
3. Slocum R. D., Furey M. J.: *Planta* 183, 443 (1991).
4. Tiburcio A. F., Altabella T., Borrell A., Masgrau C.: *Physiol. Plant.* 100, 664 (1997).
5. Ouchterlony O.: *Prog. Allergy.* 5, 1 (1959).
6. Angelini R., Federico R., Bonfante P.: *J. Plant Physiol.* 145, 686 (1995).

#### 04 MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF CYTOKININ DEHYDROGENASE – ENZYME ACTIVITY DEGRADED CYTOKININS IN PLANTS

PETR GALUSZKA<sup>a</sup>, IVO FRÉBORT<sup>a</sup>,  
MAREK ŠEBELA<sup>a</sup>, MAMORU YAMADA<sup>b</sup>,  
SUSANNE JACOBSEN<sup>c</sup>, and PAVEL PEČ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic,

<sup>b</sup>Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, 753-8515 Yamaguchi, Japan, <sup>c</sup>Department of Biochemistry and Nutrition, Technical University of Denmark, Building 224, 2800 Lyngby, Denmark

An enzyme degrading cytokinins with isoprenoid side chain, previously named cytokinin oxidase, has been purified from wheat and barley grains by combination of low pressure chromatographic steps, preparative electrophoresis and FPLC. Approximately 100 µg of 1,500-fold purified enzyme preparation with about 80 % purity was obtained from 1 kg of wheat grains. Purified cytokinin dehydrogenase is a monomeric flavoprotein of 60 kDa. Flavin cofactor was confirmed by differential pulse polarography and fluorescence spectroscopy.

Previous studies suggested that enzyme requires molecular oxygen<sup>1</sup> and cytokinin oxidase had for a long time been classified as a copper-containing amine oxidase<sup>2</sup> on the basis of some other non-specific proofs. The rapid enhancement of the cytokinin oxidase activity in the presence of the copper-imidazole complexes was observed<sup>3</sup>. This enhancement was not affected by anaerobic conditions, showing that copper-imidazole complexes are substitutes for oxygen.

Interestingly, oxygen is not required and hydrogen peroxide is not produced during the catalytic reaction of enzyme from cereals that rather proceeds by dehydrogenation as confirmed by high enhancement of the enzyme activity in the presence

of artificial electron acceptors, such as phenazine methosulfate and 2,6-dichlorophenol-indophenol. 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, a precursor of naturally occurring electron acceptor ubiquinone, positively affects the enzyme activity already in micromolar concentration. So, ubiquinone could play a role in the cytokinin degradation *in vivo* and enzyme localization in cells. Therefore we have started to use a new name “cytokinin dehydrogenase” for the enzyme.

First works on cloning cytokinin oxidase gene from maize kernels appeared last year<sup>4,5</sup> and a recombinant protein with cytokinin oxidase activity was prepared by expressing the gene in yeast. N-Terminal amino acid sequence of the wheat enzyme determined in our laboratory shows similarity with a hypothetical cytokinin oxidase gene from *Arabidopsis* but does not correspond much to the maize enzyme. The enzyme from barley does not produce any legible sequence probably due to blocking N-terminus.

First attempt of cloning genes from barley and wheat were also done. Poly<sup>+</sup>mRNA was isolated from grains and used as template for RT-PCR with various combinations of primers designed on the base of homologous parts between maize and *Arabidopsis* genes. Two 413 bp fragments of genes encoding cytokinin dehydrogenase corresponding to protein C-terminus from both sources were cloned and sequenced. Both sequences show about 80 % homology with the maize gene and about 50 % homology with *Arabidopsis* genes. Searching of whole gene sequence is in progress in our laboratory now.

*This work was supported by the grants 204/94/K235 and 522/00/0121 from GA ČR and VS96154 from the Ministry of Education.*

#### REFERENCES

1. Laloue M., Fox J. E., in: *12th International Conference on Plant Growth Substances* (Bopp M., Knopp B., Rademacher W., eds.), p. 23. Heidelberg 1985.
2. Hare P. D., van Staden J.: *Physiol. Plant.* 91, 128 (1994).
3. Armstrong D. J., in: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function* (Mok D. W. S., Mok M. C., ed.), p. 139. CRC Press, Boca Raton 1994.
4. Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 328 (1999).
5. Houba-Herlin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M.: *Plant J.* 17, 615 (1999).

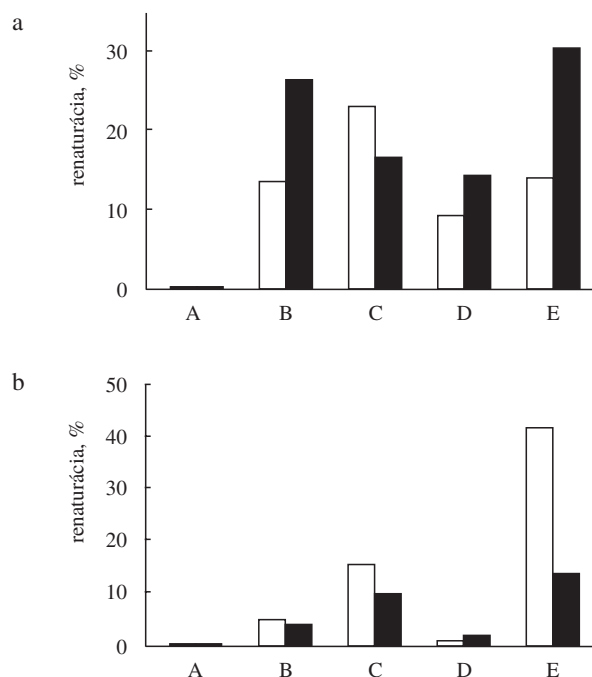
#### 05 ŠTÚDIUM VLASTNOSTÍ MALÁTDEHYDROGENÁZY ZO *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

ANNA HORVÁTHOVÁ, DARINA MIKULÁŠOVÁ  
a MARTA KOLLÁROVÁ

*Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Malátdehydrogenáza (L-malát-NAD<sup>+</sup>-oxidoreduktáza, EC 1.1.1.37) je prítomná v prokaryotických a eukaryotických organizmoch. Katalyzuje vratnú reakciu premeny malátu na





Obr. 1. a) Závislosť renaturácie MDH v prítomnosti BSA, OAA a glycerolu, (denaturácia 4,5 mol.l<sup>-1</sup> močovinou), b) závislosť renaturácie MDH v prítomnosti BSA, OAA a glycerolu (denaturácia 1,2 mol.l<sup>-1</sup> guanidínhydrochloridom); ■ 20-násobné riedenie denaturovanej MDH, □ 50-násobné riedenie denaturovanej MDH; renaturácia: A – 20 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,0, 50 mmol.l<sup>-1</sup> 2-ME, B – 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> OAA, 6 μmol.l<sup>-1</sup> BSA, 25 % glycerol v roztoku A, C – 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> OAA, 6 μmol.l<sup>-1</sup> BSA v roztoku A, D – 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> OAA, 25 % glycerol v roztoku A, E – 6 μmol.l<sup>-1</sup> BSA, 25 % glycerol v roztoku A

oxalacetát spojený s redukciovou alebo oxidáciou dinukleotidových koenzýmov NAD<sup>+</sup> resp. NADP<sup>+</sup>. Či sa vytvorí malát alebo oxalacetát závisí od fyziologických podmienok ako je redox potenciál NAD(P)<sup>+</sup> a funkcie v tkanive.

Malátdehydrogenázy sú multimerne enzýmy zložené z identických podjednotiek, obvyčajne vytvárajú diméry<sup>1,2</sup>, zriedkavo tetraméry *Bacillus subtilis*<sup>3</sup>, *Neurospora crassa*<sup>4</sup>. Unikátna malátdehydrogenáza bola objavená v rozsievke morskej *Nitzschia alba*<sup>5</sup>, ktorá je aktívna vo forme oktameru.

Porovnaním štruktúrnych a aminokyselinových sekvenčných údajov sa identifikoval počet funkčne dôležitých aminokyselín, ktoré sú prítomné vo všetkých malátdehydrogenázach. Aktívne miesto malátdehydrogenázy pozostáva z hydrofóbnej vakuoly, ktorá obsahuje väzbové miesto pre substrát a nikotínamidový kruh koenzýmu<sup>6</sup>. U viacerých organizmov bola zistená prítomnosť His-Asp páru v aktívnom mieste malátdehydrogenázy. Histidín a kyselina asparágová sú spojené vodíkovou väzbou a vytvárajú protón-prietokový systém<sup>7</sup>.

Malátdehydrogenáza zo *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 sa vyznačuje nízkou afinitou ku koenzýmu NADPH – asi 0,3 % aktivity NADH-MDH. Stanovením N-koncovkej aminokyselinovej sekvencie enzýmu sa zistilo NADH-viažúce miesto „GAAGQIG“ (v polohe 11 až 17), ktoré je identické s malátdehydrogenázou zo *S. atratus* a *Mycobacterium leprae*. Za natívnych podmienok je malátdehydrogenáza zo *S. au-*

*reofaciens* homodimér (70 kDa), s veľkosťou podjednotky 38 kDa (cit.<sup>8</sup>).

Močovina denaturuje malátdehydrogenázu v prítomnosti 25 % glycerolu v denaturačnej zmesi pri koncentrácii 6 mol.l<sup>-1</sup> a guanidínhydrochlorid pri 2,2 mol.l<sup>-1</sup>. Bez prítomnosti glycerolu v denaturačnej zmesi je malátdehydrogenáza denaturovaná 4 mol.l<sup>-1</sup> močovinou a 1,5 mol.l<sup>-1</sup> guanidínhydrochloridom. Zistili sme aditívny vplyv renaturačných látok – sérumalbumínu (BSA), kyseliny oxaloctovej (OAA) a glycerolu na denaturovanú malátdehydrogenázu (obr. 1a, b). Stanovili sme teplotné optimum malátdehydrogenázy v rozsahu 50 °C. Na základe skríningu urobeného v laboratóriu v Yorku<sup>9</sup> sme metódou visiacej kvapky pripravili kryštály malátdehydrogenázy zo *S. aureofaciens*.

## LITERATÚRA

- Breiter D. R., Resnik E., Banaszak L. J.: *Protein Sci.* 3, 2023 (1994).
- Honka E., Fabry S., Niermann T., Palm P., Hensel R.: *Eur. J. Biochem.* 188, 623 (1990).
- Yoshida A.: *J. Biol. Chem.* 240, 1113 (1965).
- Munkres K. D.: *Biochim. Biophys. Acta* 220, 149 (1970).
- Yueh A. Y., Chung C. S., Lai Y. K.: *J. Biochem.* 258, 221 (1989).
- Goward Ch. R., Nicholls D. J.: *Protein Sci.* 3, 1883 (1994).
- Lemaire M., Miginiac-Maslow M., Decottignies P.: *Eur. J. Biochem.* 236, 947 (1996).
- Mikulášová D., Kollárová M., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J. P., Kutejová E., Merník N., Egyudová I., Musrati R., Horecká T.: *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 299 (1998).
- Merník N., Lewis R., Kollárová M., Mikulášová D., Kadlecová Z.: *Gen. Physiol. Biophys.* 17, 49 (1998).

## 06 PURIFICATION, CRYSTALLIZATION AND KINETIC CHARACTERIZATION OF $\gamma$ -HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEHYDROCHLORINASE FROM *SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS* UT26

JANA SÝKOROVÁ<sup>a</sup>, MICHAELA WIMMEROVÁ<sup>a</sup>, KAMILA HYNKOVÁ<sup>b</sup>, JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>c</sup>, and YUJI NAGATA<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, <sup>b</sup>Department of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, <sup>c</sup>Laboratory of Biomolecular Structure and Dynamics, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, <sup>d</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Katahira, Sendai 980-8577, Japan

$\gamma$ -Hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH; lindane) is highly chlorinated pesticide which can cause serious environmental problems.  $\gamma$ -HCH was formerly used world-wide in agriculture, but many countries have prohibited using of  $\gamma$ -HCH from



reason of its toxicity and persistence in soil. This pollutant is degraded rapidly under anaerobic conditions, but it is extremely persistent under aerobic conditions. *Sphingomonas paucimobilis* UT26 is one of the few bacterial species known to be able to degrade  $\gamma$ -HCH under aerobic conditions.

The degradation of  $\gamma$ -HCH by *S. paucimobilis* UT26 is based on the sequential dehalogenation and the coincident oxidation of the  $\gamma$ -HCH ring by several types of dehalogenases<sup>1</sup>. A key enzyme in the metabolism of lindane is  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (LinA). LinA catalyses the first two steps of  $\gamma$ -HCH transformation. The enzyme is responsible for the conversion of  $\gamma$ -HCH to 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene via  $\gamma$ -pentachlorocyclohexene.

The first objective of this study was to purify LinA for crystallization and kinetic characterization. The enzyme was overexpressed in *Escherichia coli* JM109 using inducible expression vector<sup>2</sup>. Various combinations of chromatographic techniques were designed for purification of LinA and chosen the best one for fast and effective purification of LinA. Among the separate purification steps the hydrophobic chromatography proved to be the most effective method. Bound enzyme can be eluted only by decreasing the ionic strength almost to zero. The main advantage of such elution is that the sample obtained from hydrophobic chromatography can be directly loaded to an anion column. Following size-exclusion chromatography results in the homogenous enzyme as was confirmed by electrophoresis under native and denaturing conditions.

Different behaviour of the enzyme in solution of various ionic strength was observed, resulting in the apparent dissociation and the association of the enzyme subunits. On the basis of this observation, structural changes of LinA in a presence of urea and dithiothreitol were studied. The charge properties of LinA using method of titration curve were also studied. There are two cysteine residues per subunit of LinA but they do not seem to be responsible for intrasubunit binding. The enzyme subunits are probably held together by hydrophobic interactions and not by disulphide bonds.

Sufficient amount of homogenous LinA was obtained for crystallization experiments which are currently in progress. These experiments are intended to determine the tertiary structure of LinA enzyme by protein crystallography. In parallel, the steady-state kinetic experiments were initiated to study catalytic properties, substrate specificity and enantioselectivity of LinA.

## REFERENCES

1. Nagata Y., Miyauchi K., Takagi M.: *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 23, 380 (1999).
2. Nagata Y., Hatta T., Imai R., Kimbara K., Fukuda M., Yano K., Takagi M.: *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1582 (1993).

## 07 STRESS-INDUCED EXPRESSION AND PARTIAL PURIFICATION OF A CATALASE-PEROXIDASE FROM THE SOIL BACTERIUM *COMAMONAS TERRIGENA* N3H

BYSTRÍK POLEK<sup>a</sup>, MARCEL ZÁMOCKÝ<sup>b</sup>, JANA GODOČÍKOVÁ<sup>a</sup>, and FRANZ KOLLER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Microbiology Slovak Academy of Sciences, Štefánikova 3, 814 34 Bratislava, Slovakia,* <sup>b</sup>*Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universität Wien, Dr. Bohr-Gasse 9, A-1030 Wien, Austria*

Aerobic organisms which utilise molecular oxygen as the final electron acceptor are generally equipped with antioxidant systems to cope with the toxic derivatives of oxygen. Hydrogen peroxide is the most abundant reactive oxygen species (ROS), and probably also the most important one. It may be formed in the environment but for the majority of organisms it is also a normal metabolic by-product. Catalases (E.C. 1.11.1.6. hydrogen peroxide-hydrogen peroxide oxidoreductases) are the enzymes which most efficiently catalyse its decomposition to oxygen and water. *Comamonas terrigena* N3H is a gram-negative bacterium which was isolated from contaminated soils of middle Slovakia and it exhibits remarkable biodegradation properties. We have investigated the expression of catalases in this micro-organism in response to the various conditions of oxidative stress<sup>1</sup>. We have observed that catalatic as well as peroxidatic activity was increased under these conditions. In native PAGE the presence of two catalase isoenzymes was revealed by a specific catalase stain<sup>1</sup>, with molecular weights of about 240 kDa and 155 kDa, respectively. The former can be classified as a typical tetrameric catalase due to several typical features and was specifically induced by cadmium salts.

We focused on the isolation and characterisation of the smaller isoenzyme, obviously a dimeric catalase-peroxidase (as demonstrated by SDS PAGE). This protein is constitutively expressed, but up to 13-fold increase in the expression of this hydroperoxidase was observed when the bacteria were grown on 0.5 mmol.l<sup>-1</sup> peroxyacetic acid as sole carbon source. The cells were homogenised with glass beads in a Braun homogenisator; after Sepharose CL 6B gel filtration the samples with the highest specific activity were applied to Cibacron blue 3GA Sepharose where a major fraction of this bifunctional enzyme was bound, and could be eluted by increasing concentrations of sodium chloride in the buffer. The specific activity of the best purified fraction was 2630 U.mg<sup>-1</sup> (with hydrogen peroxide as a substrate). The peroxidatic activity of this catalase-peroxidase was determined with various 1-electron donors, including ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), guaiacol (2-methoxy-phenol), and phenol. The highest specific activity was observed with ABTS (2.5 U.mg<sup>-1</sup>). The electronic spectrum of this partially purified sample reflects the typical a, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> and g (Soret) bands. The R<sub>z</sub> value ( $A_{406}/A_{280}$ ) was 0.14; such low values appear characteristic for catalase-peroxidases, due to partial loss of haem in the course of the purification procedure. The kinetics of inhibition with the "suicide" inhibitor AT as well as the thermal

stability at 55 °C was typical for this enzyme. Due to its broad peroxidatic reaction specificity, its insensitivity to heavy metal contamination, and its high stability, this catalase could find potential application in biotechnology. It is also a candidate for the bioremediation of phenol-contaminated waste waters<sup>3</sup>.

*This work was supported by the grant 2/5099/98 of VEGA (Slovak grant agency) and by the grant P13637 of FWF (Austrian Science Fund).*

## REFERENCES

1. Zámocký M., Godocíková J., Polek B., Koller F.: Chem. Pap. 52, 333 (1998).
2. Woodbury W. A., Spencer K., Stahlmann M. A.: Anal. Biochem. 44, 301 (1971).
3. Zámocký M., Godocíková J., Koller F., Polek B. A., Leeuwenhoek J.: submitted.

## 08 LON PROTEASE IS AN ATP-DEPENDENT PROTEASE WITH THE SEVERAL IMPORTANT FUNCTIONS IN MITOCHONDRIA

EVA KUTEJOVÁ and DUŠAN PEREČKO

*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Intracellular proteolysis is responsible for the rapid degradation of the abnormal proteins as well as for the rapid turnover of the specific unstable regulatory proteins. ATP-dependent proteases play a crucial role in this process. *Escherichia coli* contains at least five of these ATP-dependent proteases Lon, ClpAP, ClpXP, FtsH, HslVU, with the different substrate specificities and the same protease families were found in prokaryotes and in mitochondria and chloroplasts of eukaryotes<sup>1</sup>.

*E. coli* Lon protease contributes to the regulation of several important cellular functions, including radiation resistance, cell division, filamentation, capsular polysaccharide production, apoptosis, lysogeny of certain bacteriophages through the degradation of the proteins involved in this processes, like UmuD, UmuC, SulA, RcsA, CcdA,  $\lambda$ Xis,  $\lambda$ N proteins<sup>2,3</sup>. Site-specific DNA binding (TG-rich DNA promoter elements) is an additional important biochemical characteristic of the multifaceted Lon protease<sup>4</sup>.

Genes encoding Lon protease have been found in a large variety of prokaryotes, where they have been implicated in developmental pathway, as well as in the degradation of specific regulatory proteins<sup>5</sup>. In eukaryotes, Lon is found in mitochondria (yeast, human, maize, rat liver, beef adrenal cortex)<sup>5-11</sup> and has been shown to be essential for mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*<sup>7,8</sup>. It seems, that the Lon proteases has their specific proteolytic function. Lon protease from *E. coli*<sup>12</sup> and also Lon protease from maize<sup>10</sup> are able to maintain the respiration dependent growth in  $\Delta lon$  *S. cerevisiae* but are unable to restore the proteolytic activity of yeast Lon.

We isolated the Lon protease from mitochondria of *S. cerevisiae* as an ATP-dependent serine protease with the sensitive sulfhydryl group(s)<sup>6</sup>. Deletion of LON in yeast blocks ATP-dependent degradation of the mitochondrial matrix proteins, prevents growth on nonfermentable carbon source, and causes deletion in the mitochondrial genome as well as accumulation of electron-dense inclusion bodies within the matrix<sup>7,8,13</sup>. The chaperone-like function was proposed that serves to facilitate protein degradation and possibly the assembly of protein complexes<sup>14</sup>. The synthesis of mitochondrially encoded cytochrome c oxidase subunit I (CoxI) and cytochrome b (Cob) was found to be impaired in  $\Delta lon$  mutants containing mtDNA. LON-mediated proteolysis is required for the translocation of mature COXI mRNA. Moreover, deficiencies in the splicing of COXI and COB transcripts, which appears to be restricted to intron encoding mRNA maturases, were observed in cell lacking the Lon gene<sup>15</sup>.

For better understanding of the role of Lon protease in yeast mitochondria we developed a rapid procedure for purification of this protease, as well as its mutants in ATPase and protease domain to homogeneity, in the cooperation with Prof. Schatz's group in Basel. A point mutation in either ATPase or the protease site strongly inhibited the corresponding activity of the pure protein but not alter the protein's oligomerization<sup>16</sup>. Mass determination and cryoelectron microscopy identify the yeast mitochondrial Lon as a flexible ring-shaped heptamer<sup>17</sup>. *In vitro* studies of degradation of the endogeneous substrates prove the MPP $\beta$  ( $\beta$  subunit of the matrix processing peptidase) to be the substrate of the Lon. Moreover, the MPP $\alpha$  ( $\alpha$  subunit of the matrix processing peptidase) is also the substrate of this protease. Formation of the MPP $\alpha\beta$  complex protects subunits against the degradation.

*This work was supported by the grant VEGA MŠ SR a SAV 2/6006/99.*

## REFERENCES

1. Gottesman S.: Annu. Rev. Genet. 30, 465 (1996).
2. Gonzales M., Frank E. G., Levine A. S., Woodgate R.: Gen. Develop. 12, 3889 (1998).
3. Suzuki C. K., Rep M., van Dijn J. M., Suda K., Grivell L. A., Schatz G.: TIBS 22, 118 (1997).
4. Fu G. K., Smith J. M., Markovitz D. M.: J. Biol. Chem. 272, 534 (1997).
5. van Melderen L., Gottesman S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 6064 (1999).
6. Kutejová E., Ďurčová G., Surovková E., Kužela Š.: FEBS Lett. 329, 47 (1993).
7. van Dyck L., Pearce D. A., Sherman F.: J. Biol. Chem. 269, 238 (1994).
8. Suzuki C. K., Suda K., Wang N., Schatz G.: Science 264, 273 (1994).
9. Wang N., Gottesman S., Willingham M. C., Gottesman M. M., Maurizi M. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 11247 (1993).
10. Barakat S., Pearce D. A., Sherman F., Rapp W. D.: Plant Mol. Biol. 37, 141 (1998).
11. Goldberg A. L.: Eur. J. Biochem. 203, 9 (1992).
12. Teichmann U., van Dyck L., Guiard B., Fisher H., Glock-

- shuber R., Neupert W., Langer T.: J. Biol. Chem. 271, 1137 (1996).
13. Wagner I., Arlt H., van Dyck L., Langer T., Neupert W.: EMBO J. 13, 5135 (1994).
  14. Rep M., van Dijl J. M., Suda K., Schatz G., Griwell K. A., Suzuki C. K.: Science 274, 103 (1996).
  15. van Dyck L., Neupert W., Langer T.: Gen. Develop. 12, 1515 (1998).
  16. van Dijl J. M., Kutejová E., Suda K., Perečko D., Schatz G., Suzuki C. K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 10584 (1999).
  17. Stahlberg H., Kutejová E., Suda K., Wolpensinger B., Lustig A., Schatz G., Engel A., Suzuki C. K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 6787 (1999).

## 09 BEHAVIOR OF INTRACELLULAR SERINE PROTEINASE OF *BACILLUS MEGATERIUM* UNDER SALT STRESS

DAVID NEKOLNÝ, LIBUŠE VÁCHOVÁ,  
and JIŘÍ CHALOUPKA

Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology AS CR,  
Videňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Each organism is challenged by several more or less deleterious stress stimuli in its natural habitat. To face unfavorable conditions successfully, organisms have evolved a complex system of adaptation strategies. Some of the adaptation mechanisms are universal, being induced under miscellaneous stress conditions in all organisms from bacteria to humans. One of the most general responses to a stress challenge is an acceleration of protein turnover as a consequence of a protein injury. On the other hand, among stress factor-specific responses an accumulation of compatible solutes is the most typical reaction to salt stress. Compatible solutes (osmoprotectants) not only help the cell to restore the turgor and reduce an inhibitory effect of a cytoplasmic salt concentration but also stabilize proteins or protect them against chemical/structural modification. This preserves protein functionality and prevents early catabolic removal of the protein. This may be part of the reason why the salt stress induces an increased resistance (cross-protection) to other subsequent stresses (heat, oxidative, ethanol).

Although several components and events including chaperones, protein modification, intramolecular interactions are involved in the control of intracellular proteolytic process, the role of individual intracellular proteinases still remains a cardinal question. Furthermore, there is only scant data about the effect of the salt stress on intracellular proteolytic apparatus, although the effect of some stresses on intracellular protein catabolism is well characterized.

ISP-1 (intracellular serine proteinase) is the dominant calcium activated endopeptidase, which represents more than 80 % of the total proteolytic activity determined *in vitro*. Preliminary data, however, suggest that only a minor portion of the enzyme is active *in vivo*. It was found that the activity of ISP-1 is controlled by its activation and by a specific

inhibitor rather than by the synthesis of ISP-1 itself. The activation of ISP-1, which probably includes auto-processing, is triggered by calcium ions *in vitro*. The presence of calcium thus seems to be essential not only for ISP-1 action but also for its activation *in vivo*.

During our study of heat and salt stresses, we found that ISP-1 is a stress responsive protein. The synthesis and activity of ISP-1 is downregulated in growing and increased in starving populations of *B. megaterium* under stress conditions. This strongly contrasts with protein catabolism under salt stress conditions. While salt stress increases intracellular protein degradation in a growing population, it decreases the assayed activity of ISP-1. By contrast, the activity of ISP-1 is increased during inhibition of sporulation of *B. megaterium* by salt stress, when protein degradation is strongly decreased.

In this work, we focused on the effect of increased salt concentration on the activity of ISP-1. We discuss enzyme properties of ISP-1 in complex protein samples and potential molecular adaptation of ISP-1 to salt stress.

This work was supported by CR Grant Agency (204/95/1050, 204/96/1261 and 204/00/0488).

## 10 PŘIROZENÉ INHIBITOR-PROTEINASOVÉ KOMPLEXY A JEJICH DETEKCE

JAROMÍR KOTYZA

Ústav biochemie, Lékařská fakulta UK v Plzni, Karlovarská  
48, 301 66 Plzeň

Proteolytické enzymy jsou nejen fyziologickou nutností, ale i potenciálním rizikem, neboť, vymknou-li se kontrole, mohou destruovat buněčné a tkáňové proteiny. Příroda disponuje dvěma základními regulačními mechanismy: 1) aktivací neaktivních zymogenů a 2) tvorbou komplexů aktivních enzymů s proteinovými inhibitory. Vzhledem k široké paletě přítomných inhibitorů je enzym-inhibitorový komplex běžnou formou existence proteinasy a často také předpokladem její eliminace. Při hodnocení rovnováhy proteolytických a anti-proteolytických aktivit v biologických vzorcích v rámci klinické diagnostiky nebo patogenetického výzkumu je třeba uvažovat jak volnou, tak vázanou formu proteolytického enzymu. Metodický přístup záleží především na typu enzym-inhi-

Tabulka I  
Přehled přirozených inhibitor-proteinaseových komplexů

Proteinasy	Inhibitory	Charakter komplex
Ser	„malé“	reverzibilní
Ser	serpiny	efektivně ireverzibilní
Cys	cystatiny	reverzibilní
Metallo	TIMPs	reverzibilní
Nespec.	$\alpha_2$ -makroglobulin	ireverzibilní

bitorové dvojice (tab. I). Přírodní inhibitory vytvářejí většinou relativně pevné komplexy ekvimolárního složení, liší se však schopností disociace a odolností vůči denaturantům (např. SDS), což je dáno povahou inhibičního mechanismu, zejména pak typem vazeb (kovalentní/nekovalentní). Příslušné analytické metody zahrnují: 1) elektroforézu za nativních a denaturačních podmínek, 2) zymografickou elektroforetickou variantu (s kopolymerizovaným nebo následně přikládáním substrátem), 3) izoelektrickou fokusaci, 4) imunochemickou detekci, 5) chromatografickou izolaci. Z povahy interakcí např. vyplývá, že pro komplexy cysteinových proteinas a metaloproteinase je třeba užít nativní prostředí, zatímco serpin-proteinase komplex je možno studovat v podmínkách SDS-PAGE. V této souvislosti je zajímavé, že při zymografickém provedení vykazují proteolytickou aktivitu i frakce serpinových komplexů<sup>1</sup>, což je vysvětlováno „větvenou cestou“ interakce serpinů s příslušnými proteasami<sup>2</sup>.

Současná studie předkládá elektroforetické varianty detekce komplexů přírodních inhibitorů s biomedicínsky relevantními proteinasami.

*Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ NC/6088-3/2000.*

## LITERATURA

1. Kotyza J., Varghese A. H., Korza G., Sunderman F. W.: *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 266 (1998).
2. Gettings P. G. W., Patston P. A., Olson S. T.: *Serpins: Structure, Function and Biology*. Chapman & Hall, New York 1996.

## 11 COMPARISON OF ASPARTIC PROTEINASES OF DIFFERENT ORIGIN IN THE RESPECT OF THE AMOUNT OF PHOSPHATE IONS IN THE MOLECULE

ZDENKA KUČEROVÁ<sup>a</sup> and JIŘÍ KUČERA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Pathological Physiology, Charles University, U nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic,* <sup>b</sup>*Food Research Institute, Prague, Radiová 7, 102 31 Prague 10, Czech Republic*

Aspartic proteinases of gastric mucosa are involved in food digestion. The activity of these enzymes is derived from a number of molecular variants of pepsinogens. All animal species studied have been shown to produce aspartic acid proteinases homologous to human pepsinogen A, B and C (EC 3.4.23.1, EC 3.4.23.2, and EC 3.4.23.3). The enzymes are secreted as pepsinogens and transformed to pepsins, which hydrolyse the nutritional proteins under acidic conditions.

The presence and relative concentration of pepsin A (pepsin) and pepsin C (gastricsin) vary according to vertebrate species, genetic variation, and, at least in human, with different gastric diseases as well<sup>1</sup>. Three pepsins and two gastricsin isoenzymes, for instance, are present in human stomach<sup>2</sup>. Only pepsin is present in pig<sup>3</sup> and only gastricsin in rat<sup>4</sup>. Human pepsinogen A consists of five isozymogens designed isozymogen Pg1–Pg5. Two additional bands of pepsinogen C are

designed as Pg6 and Pg7 isozymogens. The animal other than human have several isozymogens of pepsinogen as well. Post-translation phosphorylation might play an essential physiological function by improving stability and integrity of pepsin. It may be suggested that the amount of enzymes may correlate with genetic type and gastric diseases. Higher concentration of phosphate ions was observed at patients with gastric cancer<sup>5</sup>.

In this study the individual isozymogens of human, dog, rat, pig, and fish aspartic proteinases are compared in the respect of the amount of phosphate ions in the molecule. Samples of resected stomach of 113 human patients (gastric resection was performed in 47 patients with duodenal ulcer, 25 patients with gastric ulcer and 41 patients with gastric carcinoma), 50 rats, 5 fish, 4 dogs and commercial preparate of pig pepsinogen were examined.

Phosphate ions concentration in protein was determined using immobilised metal ion chromatography with bound Fe<sup>3+</sup> ions. The column packed with IDA-Agarose loaded with Fe<sup>3+</sup> was equilibrated with sodium acetate. Sample was applied and elution was effected with sodium phosphate.

Table I  
Percentage of phosphorylated molecules of pepsinogens

Pg	1	2	3	4	5	6	7
Human	75	80	81	81	72	72	72
Pig	100	100	–	–	–	–	–
Dog	0	0	–	–	–	–	–
Rat	40	0	–	–	–	–	–
Fish	30	30	–	–	–	–	–

Amount of phosphate ions per molecule of individual isozymogens of pepsinogen is shown in Table I. Human pepsinogens contain 0 to 3 phosphate ions per molecule of protein, one sample contains molecules of the same isozymogens of pepsinogen with and without phosphate ions. The phosphate is rather loosely bound to human pepsinogen molecules. Pepsinogen samples of patients with gastric carcinoma contain higher amount of phosphate ions. All molecules of pig pepsinogen are phosphorylated and phosphate is bound very tightly in this case. Dog pepsinogen molecules don't contain any phosphate ions. Some molecules of faster fraction of rat pepsinogens contain phosphate ions, that one of slower fraction does not. Only some of fish pepsinogens contain phosphate ion in their molecule.

*The work was supported by the grant of the Grant Agency of the Czech Republic No. 303/98/1121.*

## REFERENCES

1. Samloff I. M.: *Gastroenterology* 96, 586 (1989).
2. Pals G. et al: *Genomics* 4, 137 (1989).
3. Foltmann B.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 311 (1988).
4. Ichihara Y. et al: *Eur. J. Biochem.* 161, 7 (1986).
5. Kučerová Z.: *J. Chromatogr.* 489, 390 (1989).



## 12 STUDIUM PROTEOLYTICKÝCH ENZYMŮ Z PLODŮ ANANASU

MICHAELA POLÁKOVÁ<sup>a</sup>, IVANA MÁROVÁ<sup>a</sup>,  
RADOVAN POLCAR<sup>a</sup>, A. KORGO<sup>b</sup> a MILAN DRDÁK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická  
VUT v Brně, <sup>b</sup>Suntropic Trade Ltd., Basel, Switzerland

*Ananas comosus* je druh tropického ovoce z čeledi Bromeliaceae. Obsahuje řadu biologicky aktivních látek, jako jsou vitaminy C, B a E, karotenoidy (β-karoten, lutein), flavonoidy, vlákninu a další. V plodech je přítomno asi 0,5 až 1,0 % bílkovin, převážně s proteolytickou aktivitou, které vesměs patří do skupiny papainových cysteinových proteas<sup>1</sup>. V celé rostlině jsou přítomny celkem čtyři cysteinové proteasy: s-bromelin, f-bromelin, ananain, comosain. s-Bromelin (izolovaný ze stonků) byl podrobně prostudován a je hojně používán v potravinářském průmyslu (tenderizace masa), koželužském a farmaceutickém průmyslu (multienzymové preparáty, vitamínové preparáty; diagnostické soupravy)<sup>2</sup>. O f-bromelinu (izolovaném z plodů) jsou informace dosud neúplné. Vzhledem k rostoucímu zájmu o využití ananasových produktů jako složek či doplňků potravy byly provedeny experimenty týkající se srovnání vlastností a proteolytického účinku s-bromelinu a f-bromelinu a vlivu vybraných faktorů na uchování enzymové aktivity.

Nejvyšší obsah f-bromelinu byl nalezen v povrchových vrstvách plodu a v horní části<sup>3</sup>. Čerstvá šťáva vymačkaná z plodů ananasu obsahuje v závislosti na stupni zralosti 6–11 mg.ml<sup>-1</sup> bílkovin, z nichž průměrně 20 % představuje f-bromelin<sup>4</sup>. Specifická aktivita bromelinu je vyšší u méně zralých plodů. Teplotní optimum účinku je 20–23 °C, pH optimum je 7–8. Pro dlouhodobé uchování zmrazené šťávy je optimální pH 6, při kterém za 4 měsíce došlo ke ztrátě aktivity bromelinu o 14 %.

Podle výsledků elektroforézy SDS-PAGE jsou s-bromelin i f-bromelin tvořeny jednou podjednotkou, f-bromelin má molekulovou hmotnost 23 800 Da, molekulová hmotnost s-bromelinu je vyšší, 26 100 Da. Izelektrický bod s-bromelinu je 10,5, f-bromelin má pI vyšší než 11. Optimální pH aktivity je u s-bromelinu 6,5–7 u f-bromelinu 7–8. K tepelné denaturaci dochází u s-bromelinu při teplotě vyšší než 70 °C, u f-bromelinu při teplotě 65 °C. f-Bromelin je odolný vůči působení žaludeční a střevní šťávy (na základě experimentů s umělou žaludeční a střevní šťávou lze říci, že si f-bromelin zachoval 30 % ze své původní aktivity).

Oba enzymy obsahují v aktivním centru zbytek Cys a vykazují klasickou Michaelisovu kinetiku. Jsou inhibovány modifikacími činidly –SH skupin. Substrátová specifita obou enzymů je široká a příliš se neliší. Rozdílný je ale proteolytický účinek obou enzymů. s-Bromelin štěpí proteinové substráty na směs peptidů o velikosti 5–8 kDa, účinkem f-bromelinu vznikají polypeptidy o velikosti nad 10 kDa. V obou případech je hydrolýza neúplná.

## LITERATURA

1. Nagy S., Chin Shu Chen, Shaw P. E., v: *Fruit Juice*

*Processing Technology*, str. 378. Agscience, Auburndale 1993.

2. Lodh S. B., Divakar N. G., Chadha K. L., Melanta K. R., Serveraj Y.: *Indian J. Horticult.* 30, 381 (1973).
3. Márová I., Korgo A., Drdák M., Čvančarová P., Očenášková J., Polcar R.: *Book of Abstracts, 1<sup>st</sup> Meeting on Chemistry & Life*, 9.–10. září 1999, Brno, ČR, str. 148.
4. Márová I., Poláková M., Polcar R.: *XXXI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin*, 22.–24. května 2000, Skalský dvůr, ČR.

## 13 EFFECT OF TANNINS, THEIR DERIVATES AND SOME SYNTHETIC INHIBITORS ON PROTEASES ACTIVITY OF *ASPERGILLUS ORYZAE IN VITRO*

MARIÁN KORÉNEK<sup>a</sup>, LUBOSLAVA LOHAJOVÁ<sup>a</sup>,  
IRENA ŠUTIÁKOVÁ<sup>c</sup>, VÁCLAV ŠUTIÁK<sup>b</sup>,  
LADISLAV VAŠKO<sup>a</sup>, BEÁTA KORÉNEKOVÁ<sup>c</sup>,  
JOZEF NEUSCHL<sup>b</sup>, ĽUDMILA ŠLESÁROVÁ<sup>a</sup>,  
and ANNA SOBEKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, <sup>b</sup>Department of Internal Diseases of Solipeds, Small Animals, Birds, and Pharmacology, UVM Komenského 73, 041 81 Košice, <sup>c</sup>Research Institute of Veterinary Medicine, Hlinkova 1/A, 040 00 Košice, Slovak Republic

Some digestive enzymes (probiotics) produced by numerous companies, which are used to restore and keep good health conditions of animals, are interesting from the researcher viewpoint. The Danimex company<sup>2</sup> produces an *Aspergillus oryzae* digestive enzyme that has been characterized also by other authors<sup>1,4</sup>. It is a protease that is well soluble in water, stable in the range of pH 5–9. Powdered enzyme is stable also at high temperatures. This enzyme is active not only on casein, but also on hemoglobin, egg albumin, wheat gluten, soybean proteins, edestin, etc. Preparations containing *A. oryzae* protease are well tolerated by animals at oral administration in recommended doses<sup>2</sup>, but sometimes can induce various side effects at humans. The real cause of these side effects is not known up to now<sup>4</sup>. The powdered enzyme by Danimex is not a homogenous enzyme, it contains also amylases, invertases, cellulases and other enzymes.

The aim of our work is to verify the influence of tannins and some synthetic inhibitors on *A. oryzae* protease that may contribute to inhibition of inflammatory process induced by this protease *in vivo*.

Kinetic characteristic of the activity of *A. oryzae* protease and sequential inhibitions by tannins and synthetic inhibitors (Fig. 1 and 2) were performed according to Bartík et al.<sup>1</sup>, and by modified method according to Rosival et al.<sup>3</sup> In our experiments, inhibitions of *A. oryzae* protease were measured with three synthetic inhibitors: (Ala)<sub>3</sub>-Leu-NH-EtPh (I 1), Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-NH-EtPh (I 2), and Gly-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-NH-EtPh (I 3), and tannins using a synthetic substrate Suc-(Gly)<sub>2</sub>-Phe-p-ni-

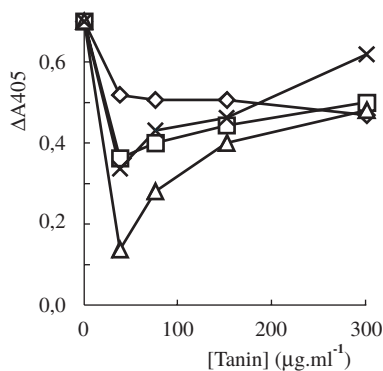


Fig. 1. **Inhibitory effect of tannins** (0–300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) on *A. oryzae* protease (450  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), determined from the course of protease hydrolysis of Suc-(Gly)<sub>2</sub>-Phe-*p*-nitroanilide (20 mmol. $\text{ml}^{-1}$ ), buffer Tris/HCl, incubation 15 min at 37 °C;  $\diamond$  tanifarm,  $\square$  pycnogenol,  $\Delta$  farman,  $\times$  tanin

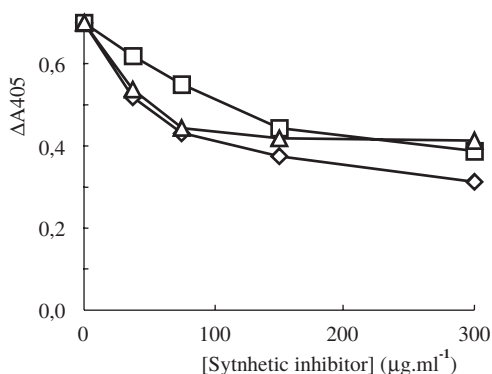


Fig. 2. **Inhibitory effect of synthetic inhibitors** (0–300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) on *A. oryzae* protease (450  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), determined from the course of protease hydrolysis of Suc-(Gly)<sub>2</sub>-Phe-*p*-nitroanilide (20 mmol. $\text{ml}^{-1}$ ), buffer Tris/HCl, incubation 15 min at 37 °C;  $\diamond$  I1,  $\square$  I2,  $\Delta$  I3

troanilide. Protease *A. oryzae* enzyme was supplied by L $\acute{e}$ čiva (Prague), the synthetic substrate and inhibitors were received from E. Kasafirek (Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague). Tannin and its derivatives were supplied by the Department of Pharmacology, UVM Košice.

It was found that tannins are better inhibitors compared to synthetic derivatives I1, I2, I3 (Fig. 1 and 2), in the range of 0–40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  they inhibit the protease from 30 to 80 %. However, their inhibition effect decreases at higher concentrations from 200–300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tannin and its derivatives are phenolic compounds that exhibit various biological effects. From the nutrition viewpoint, they are anti-nutrients, since they decrease digestibility of proteins in the digestive tract by affecting the activity of serine proteases. Inhibitory effect of tannins does not depend on the structure and amount of glycoside bonds, but only on the number of free hydroxyl groups in the tannin struc-

ture<sup>2</sup>. Healing anti-inflammatory effects of researched inhibitors will be studied in our following experiments with animals.

## REFERENCES

1. Bartík M., Šutiaková I., Kasafírek E., Šutiak V.: *Final Information of the SRP* Nu. VI-4-08/04, 1-88 (1990).
2. Danimex prospectus: Algemaines 1 (1985).
3. Rosival I., Šulík E., Šlesárová L., Korének M., Blahovec J.: *Folia vet.* 37, 19 (1993).
4. Šutiak V., Šutiaková I.: *Folia vet.* 35, 31 (1991).

## 14 ZMĚNY AKTIVNÍHO CENTRA ASPARTÁTAMINOTRANSFERASY VLIVEM GLYKACE

JAROSLAV DRŠATA<sup>a</sup>, MARTIN BERÁNEK<sup>b</sup>,  
HANA VOTAVOVÁ<sup>c</sup> a VLADIMÍR PALIČKA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemických věd, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, <sup>b</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice, 500 05 Hradec Králové, <sup>c</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Kovalentní modifikace enzymových molekul, způsobená chemicky aktivními látkami, vede zpravidla ke snížení katalytické aktivity až k úplné inaktivaci enzymu. K těmto modifikacím patří i neenzymové glykace, jejichž základem je reakce redukujícího cukru s volnou  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinových zbytků v molekule. Tyto reakce jsou studovány po řadu let především v souvislosti s výkladem molekulárních změn v průběhu diabetu. V návaznosti na naše předchozí práce<sup>1-3</sup> a práce Okady et al.<sup>4</sup>, zabývající se změnou aktivity AST pod vlivem monosacharidů, jsme studovali *in vitro* vliv glukosy, ribosy a fruktosy na absorpční a CD spektra aspartátaminotransferasy (AST, EC 2.6.1.2) ze srdce prasete jako modelového pyridoxalového enzymu. Ačkoli volný pyridoxalofosfát není opticky aktivní molekulou, ve formě vázané v katalytickém centru AST vykazuje spektrum cirkulárního dichroismu<sup>5</sup>, které je pro pyridoxalové enzymy charakteristické a mění se podle stavu koenzymu a aktivního centra. Naše výsledky ukazují, že relativně pevná vazba pyridoxal-5'-fosfátu omezuje glykaci lysinu v aktivním centru pyridoxalové (tj. výchozí) formy enzymu, takže postupný pokles katalytické aktivity, pozorovaný v průběhu několikátýdenní inkubace (4 °C, 25 °C nebo 37 °C), lze vysvětlit spíše přednostní glykací jiných lysinových zbytků v molekule. Glykace lysinu v aktivním centru závisí na poměru koncentrací cukru a enzymu. Při koncentraci enzymu ca.  $5 \cdot 10^{-5}$  mol. $\text{l}^{-1}$  se interakce s ribosou a výsledná spektra lišila podle koncentrace ribosy. Při relativně nízkých koncentracích cukru (50 mmol. $\text{l}^{-1}$ ) se mění pravděpodobně pouze ionizace koenzymu, což se projevuje jako přesun od aktivní formy (absorpční a CD vrchol 360 nm) k neaktivní formě enzymu (430 nm). Tento přesun zřejmě přispívá i k pozorovanému snížení katalytické účinnosti glykovaného enzymu. Při vysokých koncentracích cukru (0,5 mol. $\text{l}^{-1}$ ) dochází ke glykaci lysinu i v aktivním místě a posunu maxima k 330 nm.

Změny v aktivním centru, pozorované po inkubaci enzymu s 0,5 M ribosou, jsou nevratné. Zaznamenali jsme též změny signálu CD v oblasti aromatických aminokyselin (250–280 nm), které ukazují na pravděpodobnost konformační změny molekuly. Glykace v aktivním místě enzymu stoupá s reaktivitou cukru (ribosa > fruktosa > glukosa).

Výsledky jsou východiskem pro sledování faktorů, ovlivňujících glykoxidace.

*Tato práce byla podpořena grantem GA UK 95/2000 a projektem MŠMT J13/98:11600002.*

## LITERATURA

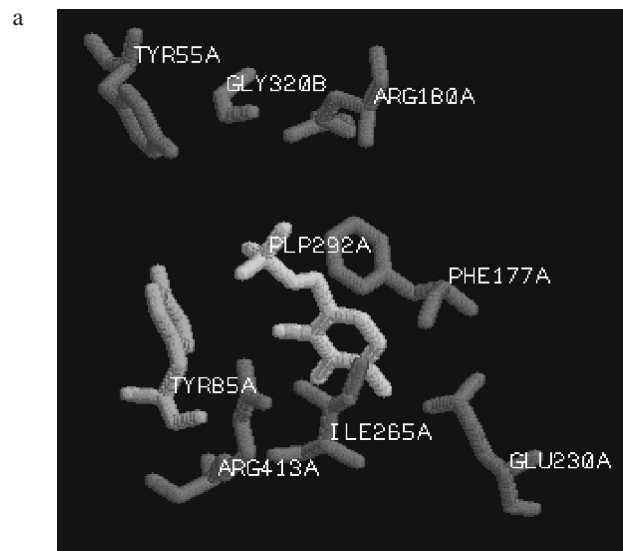
1. Dršata J., et al.: *Sborník 22. Čs. sjezdu klin. bioch.*, str. 82. Košice 1992.
2. Dršata J., et al.: *Labor. Diagnostika 1*, 52 (1996).
3. Beránek M., et al.: *Sborník Symposia klinické biochemie FONS'98*, str. 84. Karlovy Vary 1998.
4. Okada M., et al.: *J. Nutr. Biochem.* 5, 485 (1994).
5. Kallen R. G., et al., v: *Transaminases (Biochemistry: A Series of Monographs 2)* (Christen P., Metzler D. E., ed.), str. 37. J. Wiley and Sons, New York 1985.

## 15 HUMAN RECOMBINANT ORNITHINE AMINOTRANSFERASE

MICHAELA MARKOVÁ<sup>a</sup>, BLANKA KRÁLOVÁ<sup>a</sup>,  
and ROBERT A. JOHN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 3, Prague 6, 166 28, Czech Republic, <sup>b</sup>School of Biosciences, University of Wales, Cardiff CF1 3US, United Kingdom

Ornithine aminotransferase (OAT, EC 2. 6. 1. 13) catalyzes the second step of arginine degradation namely transfer of the amino group from L-ornithine to  $\alpha$ -ketoglutarate, forming



L-glutamate and glutamate-5-semialdehyde<sup>1</sup>. In animals OAT is mitochondrial enzyme that is encoded in the nucleus, but it also occurs in microorganisms. In solutions *in vitro* it occurs mainly as dimer, but *in vivo* it is considered to be hexamer<sup>2</sup>. It uses pyridoxal-5-phosphate as cofactor, one molecule per subunit. The structure of the human enzyme, both free<sup>2</sup> and with irreversibly-bound substrate analogues<sup>3,4</sup> has been solved recently. There are many similarities in structure, particularly at the active site, with other members of the same subgroup of the  $\alpha$ -family of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes<sup>5</sup>. This is especially true for GABA-aminotransferase, the active site of which contains only two significant differences from that of OAT (Ref.<sup>6</sup>) (Fig. 1). They share the same basic mechanism of reaction and the same second substrate which restores the cofactor to pyridoxal form. Besides that, both substrates that act as donors of amino group have very similar structure, too. In spite of this similarity, both enzymes show strong substrate specificity.

To explain the roles of the amino acid residues that differ in the two active sites, we used mutation analysis. Four single and two double mutants were prepared. First was a straightforward change Tyr85Ile. Three further mutants were prepared as first steps in rotating the aromatic ring of Tyr55 in OAT to Phe320 from the second subunit in GABA-aminotransferase – Tyr55Ala, Tyr55Gly and Gly320Phe. Then the double mutant with Tyr55Ala and Gly320Phe was prepared, so the aromatic ring moved to the same position as in GABA-AT. The specific activity towards L-ornithine and GABA, steady-state kinetics for all substrates and equilibrium and rate constants for single steps of the reactions of all mutants were compared with those of the wild type of human OAT.

## REFERENCES

1. Williams J. A., Bridge G., Fowler L. J., John R. A.: *Biochem. J.* 38, 221 (1982).
2. Shen B. W., Hennig M., Hohenester E., Jansonius J. N., Schirmer T.: *J. Mol. Biol.* 277, 81 (1999).

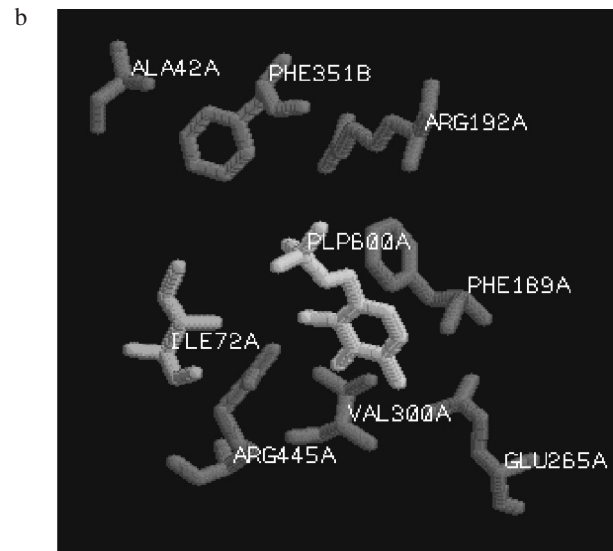


Fig. 1. Active site of a) ornithine aminotransferase and b) GABA-aminotransferase

- Shah S. A., Shen B. W., Brünger A. T.: *Structure* 5, 1067 (1997).
- Storici P., Capitani G., Müller R., Schrimmer T., Jansonius J. N.: *J. Mol. Biol.* 285, 297 (1999).
- Alexander F. W., Sandmeier E., Mehta P. K., Christen P.: *Eur. J. Biochem.* 219, 953 (1994).
- Storici P., Capitani G., De Biase D., Moser M., John R. A., Jansonius J. N., Schrimmer T.: *Biochemistry* 38, 8628 (1999).

## 16 IZOENZÝMY XYLOGLUKAN ENDOTRANGLYKOZYLÁZY Z KAPUCÍNKY (*TROPAEOLUM MAJUS*)

ZDENA SULOVÁ, RICHARD BARAN  
a VLADIMÍR FARKAŠ

*Chemický ústav Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9,  
842 38 Bratislava, Slovenská republika*

Xyloglukan endotransglykozylázy (XETs) boli izolované z rôznych druhov rastlín. Hrajú dôležitú úlohu v metabolizme bunkových stien rastlín, ich substrátom je polymérny xyloglukan (XG). Degradácia XG s XET prebieha transglykozylačným mechanizmom a zahŕňa vytvorenie komplexu enzým-substrát za súčasného uvoľnenia fragmentu XG. Druhá časť molekuly XG s novovytvoreným redukujúcim koncom ostáva naviazaná na enzým a uvoľní sa prenesením zvyšku XG na molekulu akceptora, ktorým môže byť iná molekula XG, alebo xyloglukanový oligosacharid (XG-OS) (cit.<sup>1</sup>). Pri použití rádioaktívne značených XG-OS ako akceptorov, je možné podľa spôsobu štiepenia molekuly XG očakávať tvorbu troch typov produktov, ktoré sú znázornené na obr. 1.

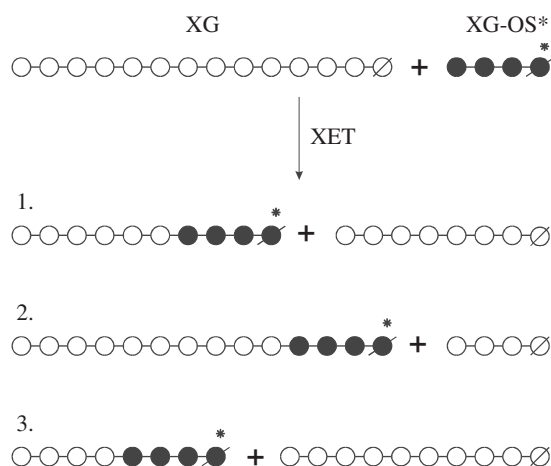
V tejto práci sme sledovali spôsob degradácie XG enzýmom izolovaným z klíčiacych semien (sXET) a z nadzemných častí (nXET) kapucínky veľkej (*Tropaeolum majus*). Tieto dva enzýmy sa odlišujú svojou fyziologickou úlohou, fyzikálno-chemickými, imunologickými aj katalytickými vlastnosťami. XET zo semien sa vyznačuje vysokou viskozimetrickou, ale aj rádiometrickou aktivitou. Naproti tomu XET z nadzemných častí rastliny má napriek vysokej aktivite nameranej rádiometrickou metódou výrazne nižšiu viskozimetrickú aktivitu. Na základe porovnania týchto dvoch aktivít sme u sXET predpokladali skôr endo-typ degradácie XG (obr. 1, prípad 1), ktorý

je spojený s rýchlym poklesom  $M_r$ , kým v prípade nXET sa dal očakávať skôr exo-typ degradácie, keďže pokles  $M_r$  je výrazne pomalší. Napriek tomu, počas inkubácie oboch enzýmov so substrátom a rádioaktívnymi XG-OS bol profil vznikajúcich produktov pri delení na Sepharose CL 4B v prvých hodinách reakcie veľmi podobný (obr. 2). Výraznejšie rozdiely sa dali pozorovať až po šiestich a viac hodinách reakcie, kde účinkom nXET dochádzalo vo výraznej miere k tvorbe produktov z nižšou molekulovou hmotnosťou (obr. 2). Existencia týchto produktov sa potvrdila pri delení reakčných zmesí na kolóne BioGel P6, kde sme v prípade nXET detegovali tvorbu produktov s molekulovou hmotnosťou zodpovedajúcou monoméru, prípadne diméru XG-OS (DP 7-9, resp. 14-18).

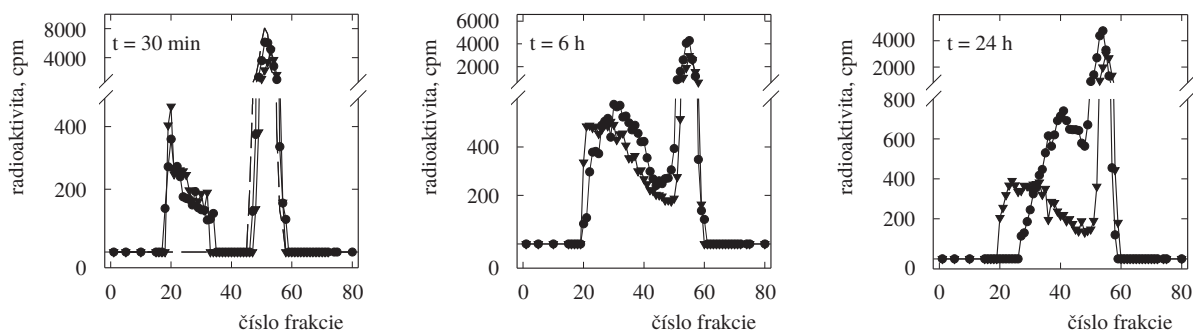
*Táto práca bola podporovaná grantom č. 2/7137/20 Slovenskej grantovej agentúry VEGA.*

## LITERATÚRA

- Farkaš V., Sulová Z., Stratilová E., Hanna R., Maclachlan G.: *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 365 (1992).

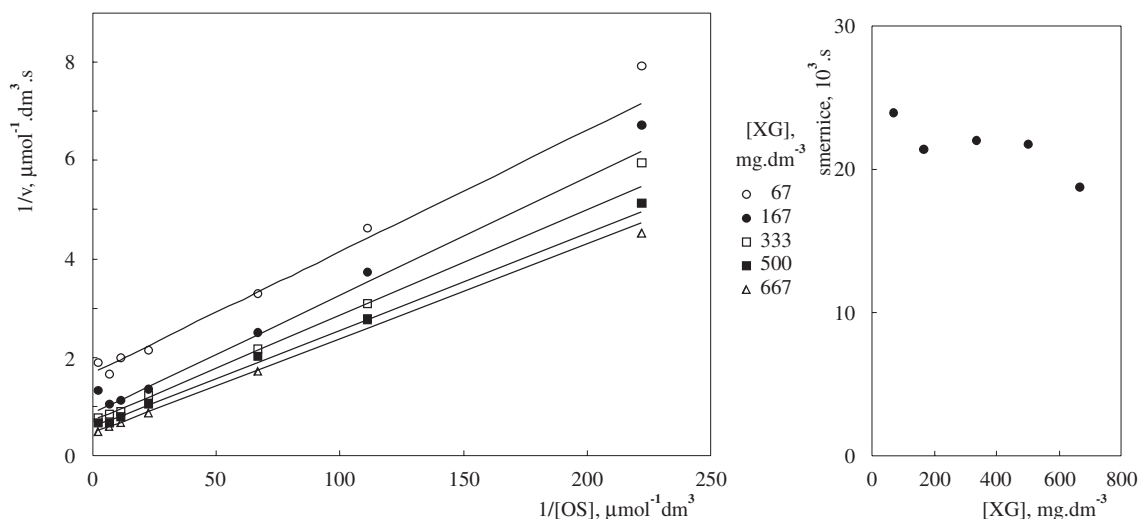


Obr. 1. Tvorba rádioaktívnych produktov pri degradácii XG účinkom XET s použitím rádioaktívnych XG-OS\* ako glykozylových akceptorov: 1. endo-typ, vznikajú produkty s približne polovičnou  $M_r$  ako pôvodný XG, 2. exo-typ, štiepenie od redukujúceho konca, vznik značených produktov s  $M_r$  blízkou pôvodnému XG, 3. exo-typ, štiepenie z neredukujúceho konca, vznik nízkomolekulových rádioaktívnych fragmentov



Obr. 2. Porovnanie rádioaktívnych produktov reakcie XET z naklíčených semien (●) a z nadzemných častí rastliny (▼) v rôznych časoch reakcie





Obr. 1. Graf závislosti  $1/v = f(1/[OS])$  pri rôznych konštantných koncentráciách XG (a), závislosť smernice na koncentracii XG (b)

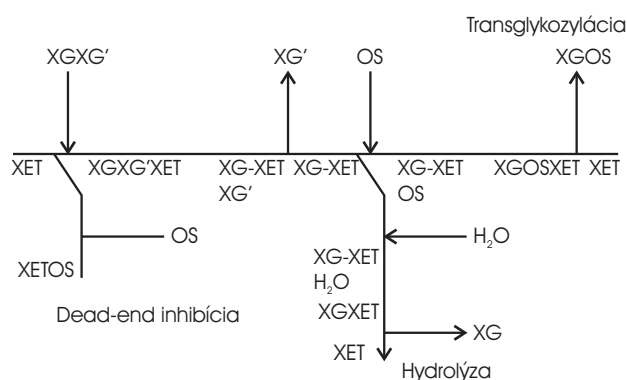
## 17 PING-PONG REAKČNÝ MECHANIZMUS XYLOGLUKAN ENDOTRANSGLYKOZYLÁZY (XET) ZO SEMIEN KAPUCÍNKY

RICHARD BARAN, ZDENA SULOVÁ  
a VLADIMÍR FARKAŠ

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava

Rastlinná xyloglukan endotransglykozyláza (XET, EC 2.4.1.207) degraduje xyloglukan transglykozylačným mechanizmom, pričom ako glykozylový akceptor môžu slúžiť iné molekuly xyloglukanu (XG), resp. xyloglukanové oligosacharidy. Transglykozylácia prebieha pri zachovaní anomericity štiepenej glykozidickej väzby. Takýto mechanizmus predpokladá tvorbu kovalentného glykozyl-enzymového komplexu XG-XET (cit.<sup>1</sup>). Nakoľko sa jedná o dvojsubstrátovú reakciu, snažili sme sa pomocou kinetických meraní rozlíšiť, či reakcia prebieha mechanizmom typu ping-pong, alebo sa jedná o usporiadaný sekvenčný mechanizmus. Ako substráty sme použili vysokomolekulárny XG a trícium značené oligosacharidy DP 7-9 odvodené od xyloglukanu (OS\*). Rýchlosť reakcie sa stanovovala rádiometrickou metódou, kde sa monitorovalo zabudovanie rádioaktívnych OS\* do vysokomolekulárneho XG (cit.<sup>2</sup>). Merala sa teda závislosť rýchlosti reakcie na koncentrácii jedného zo substrátov, pričom koncentrácia druhého substrátu bola udržiavaná na konštantnej úrovni (obr. 1). Získané výsledky sa štatisticky spracovávali a fitovali do rovníc popisujúcich jednotlivé reakčné mechanizmy. Z možných modelov najviac vyhovoval model pre ping-pong reakčný mechanizmus, pričom pozdĺž reakčnej koordináty môže dochádzať k dvom bočným reakciám: tvorbe neproduktívneho komplexu XET-OS (dead-end inhibícia), alebo k transferu glykozylového zvyšku z XG-XET komplexu na vodu (hydrolyza, obr. 2).

Táto práca bola podporovaná grantom č. 2/7137/20 zo Slovenskej grantovej agentúry VEGA.



Obr. 2. Schéma znázorňujúca rozvetvený reakčný mechanizmus pre XET

## LITERATÚRA

1. Sulová Z., Takáčová M., Steele N. M., Fry S. F., Farkaš V.: *Biochem. J.* 330, 1475 (1998).
2. Fry S. F., Smith R. C., Renwick K. F., Martin D. J., Hodge S. K., Matthews K. J.: *Biochem. J.* 282, 821 (1992).

## 18 PECTIN DEGRADING GLYCOSIDE HYDROLASES OF FAMILY 28: SEQUENCE FEATURES, SPECIFICITY AND EVOLUTION

OSKAR MARKOVIČ<sup>a</sup> and ŠTEFAN JANEČEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovakia, <sup>b</sup>Institute of Microbiology, Slovak Academy of Sciences, Štefánikova 3, 814 34 Bratislava, Slovakia

Pectin-degrading glycoside hydrolases constitute the family 28 in the sequence-based classification<sup>1</sup>. This family consists

of polygalacturonase (EC 3.2.1.15), exopolygalacturonase (EC 3.2.1.67), exo-poly- $\alpha$ -galacturonidase (EC 3.2.1.82), rhamnogalacturonase (EC 3.2.1.-), and endo-xylogalacturonan hydrolase (EC 3.2.1.-). All the family 28 members act with an inverting mechanism<sup>2</sup>.

At present the family contains more than 100 complete amino acid sequences<sup>3</sup> taxonomically belonging to bacteria, fungi and plants with one insect representative. Tertiary structures were determined for *Aspergillus aculeatus* rhamnogalacturonase<sup>4</sup> and two polygalacturonases from *Erwinia carotovora*<sup>5</sup> and *A. niger*<sup>6</sup>. All adopt the so-called parallel  $\beta$ -helix structural domain<sup>7</sup> first observed in pectate lyase C.

Several comparison of amino acid sequences of bacterial, fungal and plant polygalacturonases were performed<sup>8,9</sup>, however, detailed sequence analysis of entire family 28 is still lacking. The running genome projects, yielding numerous sequences of putative proteins with similarity to those of this family, support the importance of such study. The aim therefore was to compare all the available sequences of members of this family and present their detailed evolutionary relationships.

The evolutionary tree based on the alignment of 114 different sequences of endo- and exo-polygalacturonases revealed the clustering that, in principle, respects both the taxonomy and the enzyme specificity. All these enzymes contain the conserved sequence regions<sup>8-10</sup> comprising the residues 178\_ntD, 201\_DD, 222\_gHG, and 256\_riK as well as the invariant Tyr291 (*A. niger* polygalacturonase II numbering).

The only insect (i.e. animal) representative seems to be most related to fungal endopolygalacturonases. Xylogalacturonan hydrolase possesses all the conserved sequence regions characteristic of polygalacturonases, while the rhamnogalacturonases evidently lack the histidine residue corresponding with the invariant His223 of polygalacturonases. From the evolutionary point view, fungal endo-xylogalacturonan hydrolase is clustered with the fungal exopolygalacturonases, the rhamnogalacturonases being placed on branch adjacent to them.

*This study was supported by VEGA grants 2/6045/99 and 2/7142/20.*

## REFERENCES

1. Henrissat B.: *Biochem. J.* 280, 309 (1999).
2. Ly H. D., Withers S.: *Annu. Rev. Biochem.* 68, 487 (1999)
3. Coutinho P. M., Henrissat B.: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html> (2000).
4. Petersen T. N., Kauppinen S., Larsen S.: *Structure* 5, 533 (1997).
5. Pickersgill R., Smith D., Worboys K., Jenkins J.: *J. Biol. Chem.* 273, 24660 (1998).
6. Van Santen Y., Benen J.A., Schroter K.H., Kalk K.H., Armand S., Visser J., Dijkstra B.W.: *J. Biol. Chem.* 274, 30474 (1999).
7. Yoder M. D., Keen N. T., Jurnak F.: *Science* 260, 1503 (1993).
8. Stratilová E., Dzurová M., Markovič O., Jörnvall H.: *FEBS Lett.* 382, 164 (1996).

9. Stratilová E., Mislovičová D., Kačuráková M., Machová E., Kolárová N., Markovič O., Jörnvall H.: *J. Protein. Chem.* 17, 173, (1998).
10. Torki M., Mandaron P., Mache R., Falconet D.: *Gene* 242, 427 (2000).

## 19 THE PRIMARY STRUCTURE OF CARROT PECTIN METHYLESTERASE WITH A BLOCKED N-TERMINUS

OSKAR MARKOVIČ<sup>a</sup>, ELLA CEDERLUND<sup>b</sup>, WILLIAM J. GRIFFITS<sup>b</sup>, and HANS JÖRNVALL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovakia,* <sup>b</sup>*Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, S-17177 Stockholm, Sweden*

Pectin methylesterase (PME) (EC 3.1.1.11) catalyzes the deesterification of pectin and belongs to the large group of pectic enzymes. PMEs were found in all higher plant tested and are produced by pathogenic bacteria and fungi; they take part in the modulation of cell wall structural features during fruit ripening, in cell wall extension, pollen germination, in defense reactions against pathogens and mainly in preparing the substrate for the action of polygalacturonases and pectate lyases.

PME was identified in carrots more than 140 years ago<sup>1</sup> and the most alkaline form of this enzyme (pI 9.8) was recently isolated from carrot roots<sup>2</sup>. The N-terminus of this PME form was resistant to Edmann degradation and the possibility that N-terminus was acetylated was excluded after hydrolysis with trichloroacetic acid. The homogeneity of this isolated PME form was proved by C-terminal sequencing which rendered five residues from C-end: Leu-Gly-Leu-Ser-Phe-; the sixth residue was not possible to obtain (the next sequencing of separated peptides from proteases cleavages showed that the sixth residue was Pro, at which the C-terminal sequencing has stopped). The carboxymethylated enzyme was specifically cleaved by Lys-protease and peptides were separated by reverse phase HPLC and sequenced. The obtained peptide structures exhibited a striking similarity to those of tomato leaves PME (Ref.<sup>3</sup>). One of Lys-protease peptides was resistant to Edmann degradation and its average mass (1978.1) showed, by comparing with that of tomato leaves PME, the possibility that it could be the N-terminal peptide of carrot PME. By means of tandem mass spectrophotometry<sup>4</sup> it was possible to estimate the sequence of this peptide; the first residue was pyroglutamate and the sequence of 20 residues was: p-Gln-Ser-Ser-Thr-Val-Thr-Pro-Asn-Val-Val-Val-Ala-Ala-Asp-Gly-Ser-Gly-Asp-Tyr-Lys. There was only one change in residue No. 8, which was in tomato leaves PME structure Asp. The position of Lys-protease peptides was ascertained by sequencing the peptides obtained by specific cleavage of carboxymethylated carrot PME by endoproteinase Asp-N and subsequent separation by reverse phase HPLC.

The polypeptide chain of carrot PME was composed of 319 residues and shared 85.9 % identity with tomato leaves PME cDNA structure, as well as more than 80 % identity with two PEMs from Valencia orange (U82973 and U82975), and

*Arabidopsis thaliana* PME2 (U25649). These four plant PMEs together with carrot PME represent in phylogenetic tree (prepared from 25 primary structures of plant, fungal and bacterial PMEs) one distinct subgroup of plant PMEs.

From the similarity of N-terminal part of some plant PMEs with that of carrot PME, it is possible to predict the N-terminal residue p-Gln in seven plant PMEs (Q43043, U49330, U82973, U25649, U82975, X95991 and X81585).

*This study was supported by the VEGA grant 2/142/20 and SMRC project 13X-3532.*

## REFERENCES

- Frémy E.: Ann. Chim. Phys. 24, 3 (1840).
- Stratilová E., Markovič O., Dzúrová M., Malovíková A., Capek P., Omelková J.: Biológia (Bratislava) 53, 731 (1998).
- Gaffe J., Tiznado M. E., Handa A. K.: Plant Physiol. 114, 1547 (1997).
- Morris H. R., Paxton T., Dell A., Langhorne J., Berg M., Bordoli R. S., Hoyes J, Bateman H. R.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 10, 889 (1996).

## 20 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF $\alpha$ -GALACTOSIDASE FROM THE THERMOPHILIC FUNGUS *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

VLADIMÍR PUCHART, MÁRIA VRŠANSKÁ,  
and PETER BIELY

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

$\alpha$ -Galactosidases were isolated from a wide variety of organisms including bacteria, yeasts, fungi, plants and animals. However, only some of them are active and stable at higher temperatures. Just these enzyme properties meet industrial demands. The most important industrial applications of  $\alpha$ -galactosidases is in the sugar and soy milk industry as well as in softwood Kraft pulp bleaching.

Recently we found out that a strain of  $\alpha$  thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, produced high levels of extracellular endo- $\beta$ -1,4-mannanase (EC 3.2.1.78) and  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) during growth on locust bean gum as a carbon source<sup>1</sup>. The  $\alpha$ -galactosidase was purified to homogeneity by combination of anion exchange and hydrophobic interaction chromatographies. On SDS PAGE the enzyme showed a single, somewhat diffuse band with a molecular weight of 57 kDa that corresponded to a detected glycoprotein. On isoelectric focusing the enzyme afforded several protein bands that coincided with activity bands; pI value of the major form was 5.2. The enzyme was partially amino acid sequenced and N-terminal and two internal sequences were determined as follows: LVRPGNVGKLPALG wNTwNAFGcDIDAT, IMTAANEVNLG and DHYSVEL ESHDVAALVVG. The sequences showed a high degree of similarity with *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galactosidase AGLI that belongs to family 27 of glycosyl hydrolases. The

enzyme showed maximum activity at pH 4.5–5.0 and 65 °C and showed full stability in pH range 2.5–7.5 and up to 60 °C. Besides artificial aryl  $\alpha$ -galactosides the enzyme was active also on naturally occurring  $\alpha$ -galactosylated oligosaccharides such as melibiose, raffinose and stachyose. In addition, the enzyme was able to release galactose as the only hydrolysis product from polymeric legume seed galactomannans to such a degree that caused precipitation of the polysaccharide from the solution. Such a property is quite rare among microbial  $\alpha$ -galactosidases.

Physico-chemical and catalytic properties of the isolated *T. lanuginosus*  $\alpha$ -galactosidase suggest that the enzyme is a promising candidate for industrial applications. The activity against polymeric substrates can be used for improvement of properties of plant galactomannans.

## REFERENCES

- Puchart V., Katapodis P., Biely P., Kremnický L., Christakopoulos P., Vršanská M., Kekos D., Macris B. J., Bhat M. K.: Enzyme Microb. Technol. 24, 355 (1999).

## 21 COLD-ACTIVE $\beta$ -GALACTOSIDASE

PETRA KARASOVÁ<sup>a</sup>, ŠÁRKA MALÁ<sup>a</sup>,  
BLANKA KRÁLOVÁ<sup>a</sup>, and NICHOLAS J. RUSSELL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, <sup>b</sup>Department of Biological Sciences, Imperial College University of London, United Kingdom*

$\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23) is the enzyme that catalyses the hydrolysis of terminal non-reducing  $\beta$ -D-galactose residues in  $\beta$ -D-galactosides. In special cases this enzyme is also able to transfer liberated galactosyl group on an acceptor different from the water. This so called transglycosylation activity can be utilized for synthesis of galactooligosaccharides, which are recognised as probiotics and health beneficial substances. The galactooligosaccharides are added to yoghurts, drinks, baby food and other dairy products, but also to other food industry products, e.g. to the chewing gums<sup>1-3</sup>.

Majority of commercially available  $\beta$ -galactosidases have the temperature optimum around 40 °C, a temperature that is not convenient for dairy production because of possible microbial contamination, and their activity at low temperature is usually much decreased. Use of cold active  $\beta$ -galactosidase from psychrophilic or psychrotolerant microorganisms for production of galactooligosaccharides directly in the milk offer a solution of the problem<sup>2</sup>.

The isolates from Antarctica obtained from the Imperial College University of London collection and the microorganisms obtained from Czech collection of microorganisms in Brno were used for the primary screening of  $\beta$ -galactosidase activity. Selected microbial producers were tested for the ability to hydrolyse the glycosidic bond of synthetic substrate X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside). In crude extracts the ability to hydrolyse the natural substrate lactose, the temperature profile of  $\beta$ -galactosidase activity and the ability to catalyse the transglycosylation were determined.

As the best producers of cold-active enzyme with desirable characteristics, the isolates CH07 and C2-2 from Antarctica were chosen. In these strains we plan to identify the genes for  $\beta$ -galactosidase and to transfer them to the selected strain without health hazard.

## REFERENCES

1. Molder H. W.: *Int. Dairy J.* 10, 383 (1994).
2. Crittenden R. G., Playne M. J.: *Trends Food Sci. Technol.* 7, 353 (1996).
3. Rastall R. A., Bucke C.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 10, 253 (1992).

## 22 KVASINKOVÁ GALAKTOZYLTRANSFERÁZA

PETER BARTEK a NADEŽDA KOLAROVA

*Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava*

Odkedy sa kvasinky stali populárne ako hostiteľské bunky expresie a sekrécie farmaceuticky a biotechnologicky dôležitých glykoproteínov, je nevyhnutné pochopiť mechanizmus kontroly biosyntézy týchto látok.

Syntéza sacharidovej časti glykoproteínov na rozdiel od bielkovinovej časti nepodlieha priamej genetickej kontrole. Na úrovni génovej regulácie je zabezpečená expresia: *i*) proteínovej časti glykoproteínu, *ii*) glykozyltransferáz a glykozidáz, ktoré sa zúčastňujú na syntéze oligosacharidovej časti glykoproteínov. Geneticky je determinovaná ich substrátová špecifita a vyžadovanie rôznych kofaktorov.

Glykozyltransferázy patria do skupiny enzýmov zúčastňujúcich sa syntézy oligosacharidových reťazcov glykoproteínov a glykolipidov. Za syntézu každej glykozidickej väzby medzi rôznymi sacharidmi je zodpovedná špecifická glykozyltransferáza, z čoho vyplýva, že ich počet sa pohybuje okolo 100. Zatiaľ len niekoľko z nich sa podarilo vyizolovať.

Medzi najviac preštudované glykozyltransferázy v kvasinkách patria manozyltransferázy<sup>1,2</sup>. V posledných rokoch sa objavili práce o galaktozyltransferázach izolovaných z membránových frakcií kvasiniek<sup>3,4</sup>.

Naše výsledky ukazujú, že v kvasinkách *Cryptococcus laurentii* existujú aspoň dve formy galaktozyltransferáz, ktoré sa navzájom odlišujú nielen ich lokalizáciou v bunke, ale aj ich rôznou aktivitou, meniacou sa počas bunkového cyklu.

Zatiaľ čo najväčší podiel rozpustnej formy galaktozyltransferázy bol pozorovaný v stacionárnej fáze rastu kvasiniek, membránovo viazaná galaktozyltransferáza vykazovala najvyššiu aktivitu v logaritmickú fáze.

Najvhodnejším akceptorom rozpustnej formy galaktozyltransferázy je manóza. Membránovo viazaná galaktozyltransferáza galaktozyluje okrem manózy aj *N*-acetylglukozamín. Obe formy galaktozyltransferáz si vyžadujú prítomnosť  $Mg^{2+}$  a ATP.

Vzhľadom k tomu, že zatiaľ popísané glykozyltransferázy kvasiniek boli vždy membránovo viazané, nemôžeme s určitosťou tvrdiť, že nami zistená rozpustná forma galaktozyltransferázy nie je uvoľnená z membrán počas mechanického rozbíjania buniek. Určenie pôvodu rozpustnej galaktozyltransferázy je predmetom nášho ďalšieho výskumu.

*Táto práca bola financovaná grantom Slovenskej grantovej agentúry pre vedu č. 2/7137/20.*

## LITERATÚRA

1. Strahl-Bolsinger S., Gentsch M., Tanner W.: *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 297 (1999).
2. Herscovics A., Orlean P.: *FASEB J.* 7, 540 (1995).
3. Chappell T. G., Warren G.: *J. Cell Biol.* 109, 2693 (1989).
4. Gemmill T. R., Trimble R. B.: *Glycobiology* 9, 507 (1999).

## 23 INTERACTION OF GUANINE PHOSPHONOMETHOXYALKYL DERIVATIVES WITH GMP KINASE ISOENZYMES

ROMANA KREJČOVÁ, KVĚTOSLAVA HORSKÁ, IVAN VOTRUBA, and ANTONÍN HOLÝ

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 10 Prague 6, Czech Republic*

Acyclic nucleoside phosphonates (ANP) – 9-[2-(phosphonomethoxy)-alkyl] derivatives of both purine and pyrimidine bases are unique antiviral agents with broad-spectrum activity against DNA viruses and/or retroviruses (i.e. human immunodeficiency virus, HIV)<sup>1-3</sup>. Moreover, some of these compounds also possess cytostatic<sup>4</sup> and antitumor activity<sup>5</sup>.

The ANP compounds need to be activated by cellular nucleotide kinases to their active forms – ANPpp, i.e. nucleoside 5'-triphosphate analogues<sup>6-9</sup> which then act as selective substrate/inhibitors of viral and cellular DNA polymerases<sup>10,11</sup> and also of retroviral reverse transcriptase<sup>12</sup>.

The aim of our work was to compare different types of biologically interesting 9-[2-(phosphonomethoxy)alkyl] compounds [(*R*)-HPMPG, (*S*)-HPMPG, PMEG, (*R*)-PMPG, (*S*)-PMPG, PMEDAP, (*R*)-PMPDAP, (*S*)-PMPDAP] with respect of their substrate activity and inhibitory potency towards GMP kinase (EC 2.7.4.8) isoenzymes from L1210 cells.

Our data prove that all GMP kinase isoenzymes tested catalyze the phosphorylation of PMEG as well as of both enantiomers of its 2-methyl derivative (PMPG) and/or hydroxymethyl derivative (HPMPG), respectively. These results are compatible with the biological activity of these compounds<sup>1-5</sup>. The both enantiomers of HPMPG are phosphorylated approximately to the same extent. However, substantially different phosphorylation pattern of the both enantiomers of PMPG by GMP kinase isoenzymes from L1210 cells indicates that the GMP-binding site of these isoenzymes does not favour the binding of the (*S*)-PMPG contrary to structurally related (*R*)-HPMPG which bears a hydrophilic  $CH_2OH$  group instead of  $CH_3$  substituent.

In addition to their substrate activity (*S*)-HPMPG, (*R*)-PMPG and PMEG also inhibit GMP kinases. The kinetics of inhibition of GMP kinase isoenzymes from L1210 cells as well as of GMP kinase from porcine brain indicate that their binding occurs only at the GMP-binding site.

*Supported by the grant No. 203/96/K001 of the Grant Agency of the Czech Republic, by grant No. NL/5423-3 of Ministry of*



Health of the Czech Republic and by Gilead Sciences (Foster City, CA, U.S.A.).

## REFERENCES

1. Naesens L., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., Neyts J., De Clercq E.: *Antiviral Chem. Chemother.* 8, 1 (1997).
2. Holý A., in: *Antibiotics and Antiviral Compounds* (Krohn K., Kirst H., Maag H., ed.), p. 455. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim 1993.
3. Terry B. J., Mazina K. E., Tuomari A. V., Haffey M. L., Hagen M., Feldman A., Slusarchyk W. A., Young M.G., Zahler R., Field A. K.: *Antiviral Res.* 10, 235 (1988).
4. Rose W. C., Crosswell A. R., Bronson J. J., Martin J. C.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 510 (1990).
5. Otová B., Francová K., Franěk F., Koutník K., Votruba I., Holý A., Sladká M., Schramlová J.: *Anticancer Res.* 19, 3173 (1999).
6. Votruba I., Bernaerts R., Sakuma T., De Clercq E., Merta A., Rosenberg I., Holý A.: *Mol. Pharmacol.* 32, 524 (1987).
7. Holý A., Votruba I., Merta A., Černý J., Veselý J., Vlach J., Šedivá K., Rosenberg I., Otmar M., Hřebabeký H., Trávníček M., Vonka V., Snoeck R., De Clercq E.: *Antiviral Res.* 13, 295 (1990).
8. Merta A., Votruba I., Jindřich J., Holý A., Cihlár T., Rosenberg I., Otmar M., Hervé T. Y.: *Biochem. Pharmacol.* 44, 2067 (1992).
9. Cihlar T., Chen M. S.: *Mol. Pharmacol.* 50, 1502 (1996).
10. Kramata P., Votruba I., Otová B., Holý A.: *Mol. Pharmacol.* 49, 1005 (1996).
11. Birkuš G., Votruba I., Holý A., Otová B.: *Biochem. Pharmacol.* 58, 487 (1999).
12. Votruba I., Trávníček M., Rosenberg I., Otmar M., Merta A., Hřebabeký H., Holý A.: *Antiviral Res.* 13, 287 (1990).

## 24 HPMPApp AS A SUBSTRATE TOWARD REPLICATIVE DNA-POLYMERASES $\alpha$ , $\delta$ AND $\epsilon$

GABRIEL BIRKUŠ<sup>a</sup>, IVAN VOTRUBA<sup>a</sup>, ANTONÍN HOLÝ<sup>a</sup>, and BERTA OTOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 10 Prague 6, Czech Republic*, <sup>b</sup>*Institute of Biology, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic*

9-(S)-(3-Hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine (HPMPA) which was found to have the potent and selective activity against a broad spectrum of DNA viruses<sup>1</sup> also exhibits antimalarial effect<sup>2</sup>. The compound is phosphorylated to its diphosphoryl derivative (HPMPApp) by AMP(dAMP) kinase<sup>3</sup> and is incorporated into cellular DNA (Ref.<sup>4</sup>) and inhibits DNA replicative polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$  (Ref.<sup>5</sup>). In this communication we have focused on substrate activity of (S)-HPMPApp toward pol  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and on the effect of cumulative insertion of HPMPA in DNA chain on the kinetics of DNA polymerization.

The relative efficiency of the HPMPApp incorporation<sup>6</sup> into template-primer TP1, which enables the maximum cumu-

lation of two molecules of HPMPA or dAMP respectively, is decreasing in the order: pol  $\epsilon$  > pol  $\delta$  = pol  $\alpha$  and is approximately 5 to 13 times lower than that for dATP.

The effect of cumulative insertion of HPMPA in DNA chain on the kinetics of polymerization was studied with the use of template-primer TP2, which enables the cumulation of four molecules of HPMPA or dAMP, respectively. The relative efficiency of the HPMPApp incorporation into this template-primer is decreasing in the order: pol  $\epsilon$  = pol  $\delta$  > pol  $\alpha$  and is approximately 6 to 24 times lower than the efficacy of dATP incorporation. The kinetic constants ( $K_m$ ,  $V_m$ ) and  $f_{ins}$  for pol  $\epsilon$  catalyzed reactions on both template-primers TP1 and TP2 are almost identical. Low  $f_{ins}$  for HPMPApp incorporation into TP2 catalyzed by DNA pol  $\delta$  is assigned to the lowering of  $\frac{HPMPAppV_m}{V_m^{dATP}}$  ratio at 8 fold decrease of  $K_m$  for this analog compared to TP1. The reaction catalyzed by pol  $\alpha$  results in approximately two-fold decrease of  $f_{ins}$  on TP2 compared to TP1, due to the increase of  $\frac{HPMPApp}{K_m}$  value. The time course of HPMPApp incorporation shows that, in contrast to pol  $\alpha$ , pol  $\delta$  can accumulate maximum two molecules of the analog into template-primer TP2 despite the fact that the analog is a better substrate for pol  $\delta$  than for pol  $\alpha$ .

This study shows, that this nucleotide analog is relatively good substrate of the replicative DNA-polymerases  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ ; after its insertion into TP1 the elongation of DNA can proceed. These findings are in agreement with our previous results on the inhibition of cellular DNA synthesis and HPMPA incorporation into genomic DNA (Ref.<sup>4,5</sup>). Moreover, a putative insertion of HPMPA molecules into the DNA chain may cause DNA damage and/or their accumulation at the 3'-end in dependence on intracellular concentration of the compound and the sequence of the replicating template can ultimately result in a block of replication. Most probably such a dual mode of DNA damage is responsible for S-M checkpoint activation<sup>7</sup> and S-phase cell cycle arrest<sup>8</sup>.

*This work was supported by the grant No. 203/96/K001 of the Grant Agency of the Czech Republic, by grant No. NL/5423-3 of Ministry of Health of the Czech Republic and by Gilead Sciences (Foster City, CA, U.S.A.).*

## REFERENCES

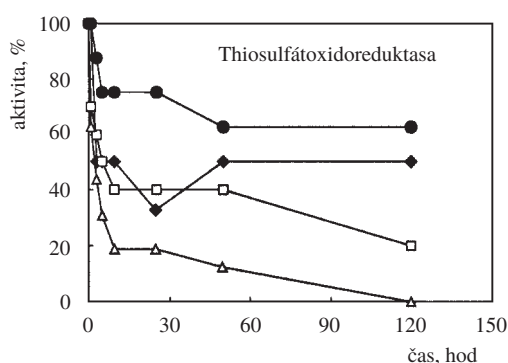
1. De Clercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986).
2. Kaminsky R., Zwegarth E., De Clercq E.: *J. Parasitol.* 80, 1026 (1994).
3. Merta A., Votruba I., Jindřich J., Holý A., Cihlár T., Rosenberg I., Otmar M., Hervé T. Y.: *Biochem. Pharmacol.* 44, 2067 (1992).
4. Votruba I., Bernaerts R., Sakuma T., De Clercq E., Merta A., Rosenberg I., Holý A.: *Mol. Pharmacol.* 32, 524 (1987).
5. Kramata P., Votruba I., Otová B., Holý A.: *Mol. Pharmacol.* 49, 1005 (1996).
6. Boosalis M. S., Petruska J., Goodman M. F.: *J. Biol. Chem.* 262, 14689 (1987).
7. Rhind N., Russell P.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 749 (1998).
8. Kaminsky R., Nickel B., Holý A.: *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 91 (1998).

## 25 STABILITA PERIPLAZMATICKÝCH ENZYMŮ SIRNÉHO METABOLISMU BAKTERIE *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*

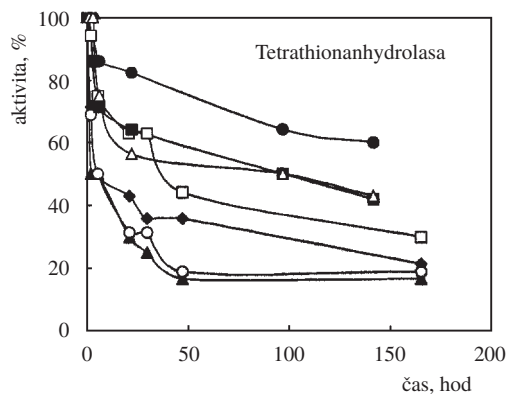
OLDŘICH JANICZEK, JANA ZEMANOVÁ  
a MARTIN MANDL

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, 611 37 Brno, Česká republika*

Bakterie *Thiobacillus ferrooxidans* je chemolithoautotrofní bakterie, která zaujímá významnou roli v dynamických cyklech rovnováhy síry a železa v biosféře díky své schopnosti oxidovat redukované sírné sloučeniny, síru a nerozpustné sulfidy kovů. Důležitým krokem pro pochopení těchto procesů, které mají velký dopad na životní prostředí je studium oxidace sírných látek na enzymové úrovni. Předkládaná práce se zabývá zjištěním stabilit dvou klíčových perioplazmatických enzymů sírného metabolismu této bakterie, thiosulfát oxidoreduktasy<sup>1</sup> a tetrathionanhydrolasy<sup>2</sup>.



Obr. 1. Stabilita thiosulfát oxidoreduktasy v závislosti na pH; závislost aktivity thiosulfát oxidoreduktasy na době uchovávání enzymu v různých pufrch: (●) 50 mmol.l<sup>-1</sup> citrátový pufr pH 3,0, (◆) 50 mmol.l<sup>-1</sup> acetátový pufr pH 5,0, (□) 50 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátový pufr pH 7,0, (Δ) 50 mmol.l<sup>-1</sup> TRIS/HCl pufr pH 8,0



Obr. 2. Stabilita tetrathionanhydrolasy v závislosti na pH a koncentraci síranu; závislost aktivity tetrathionanhydrolasy na době uchovávání enzymu v různých pufrch s proměnnou koncentrací síranu: (◆) acetátový pufr pH 5,0 + 50 mmol.l<sup>-1</sup> síran, (□) citrátový pufr pH 3,0 + 50 mmol.l<sup>-1</sup> síran, (▲) acetátový pufr pH 5,0 bez síranu, (○) citrátový pufr pH 3,0 bez síranu, (■) acetátový pufr pH 5,0 + 1 mol.l<sup>-1</sup> síran, (●) citrátový pufr pH 3,0 + 1 mol.l<sup>-1</sup> síran, (Δ) 1 mol.l<sup>-1</sup> síran amonný

pH optimum thiosulfát oxidoreduktasy se nachází v rozmezí pH 3–4 a tetrathionanhydrolasy v rozmezí pH 2,5–3. Stabilita thiosulfát oxidoreduktasy v závislosti na pH prokázala, že je enzym nejstabilnější v citrátovém pufru o pH 3,0. Enzym pro uchování své aktivity vyžaduje kyselé prostředí, ve fosfátovém pufru pH 7,0 a TRIS/HCl pH 8,0 jeho stabilita výrazně klesá (obr. 1).

Pro aktivitu tetrathionanhydrolasy je nutná přítomnost síranu nebo selenanu. Na stabilitu enzymu má klíčový vliv přítomnost síranových iontů. Důležitý je rovněž výběr vhodného pufru a jeho pH (obr. 2).

Pro uchovávání enzymů je nosnou informací kromě pH stability také teplotní stabilita. Oba enzymy jsou značně stabilní při 4 °C a lze je uchovávat při –25 °C bez výrazné ztráty aktivity.

*Tato práce byla vypracována s podporou grantu 525/00/0785 Grantové agentury České republiky.*

## LITERATURA

1. Silver M., Lundgren D. G.: *Can. J. Biochem.* 46, 1215 (1968).
2. Jong G. A. H., Hazeu W., van Dijken J. P., Frank J., Bos P., Kuenen J. G.: *Microbiology* 143, 499 (1997).

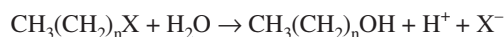
## 26 RAPID DETECTION OF HALOALKANE DEHALOGENASE ACTIVITY BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

ZDENĚK GLATZ<sup>a</sup>, MÁRIA V. MARINI<sup>a</sup>,  
MICHAELA WIMMEROVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ DAMBORSKÝ<sup>b</sup>,  
and YUJI NAGATA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, <sup>b</sup>Laboratory of Biomolecular Structure and Dynamics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, <sup>c</sup>Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Katahira, Sendai 980-8577, Japan

Halogenated aliphatic hydrocarbons constitute one of the largest groups of environmental pollutants as a result of their widespread use as solvents, pesticides, herbicides, insecticides and chemical intermediate<sup>1</sup>. Because of their toxicity, bioconcentration and persistence, the ubiquitous distribution of halogenated compounds in the biosphere has caused public concern over the possible effects on the quality of life<sup>2</sup>. The study of the biochemistry of dehalogenation processes may help to understand and evaluate the potential for their degradation in nature<sup>3</sup>. Moreover, biotransformation of organic compounds with biocatalysts offer new routes for the synthesis of intermediates.

Haloalkane dehalogenases (EC 2.8.1.1) are group of enzymes involved in the biodegradation of these compounds by catalysing cleavage of the carbon-halogen<sup>4</sup>. A molecule of the water is consumed per molecule of substrate and the reaction products are a primary alcohol, a halide and a proton:



Because of the significance of haloalkane dehalogenase for ecotoxicology and synthetic chemistry, many assay methods have been developed for this enzyme<sup>5-11</sup>. Most existing methods for determination of haloalkane dehalogenase enzymatic activity are based on measuring chloride production colorimetrically through chloride specific chemical reactions<sup>5,6</sup> or by ion-selective electrode<sup>7</sup>. However these methods have several drawbacks. The colorimetric methods employ toxic and corrosive reagents, the ion-selective electrodes equilibrate slowly and have a problem with interference by other ions.

In this work, a new sensitive method has been developed for the determination of haloalkane dehalogenase activity using capillary zone electrophoresis (CZE). The enzymatic reactions were carried out directly in thermostatted autosampler vials and the formation of product – bromide or chloride ions – was monitored by sequential CZE runs. The determinations were performed in a 75  $\mu\text{m}$  fused silica capillary using 5 mM chromate, 0.5 mM-TTAB (pH 8.4) as a background electrolyte, separation voltage 15 kV (negative polarity) and indirect detection at sample wavelength 315 nm, reference wavelength 375 nm for brominated and chlorinated substrates, respectively 0.1 M  $\beta$ -alanine – HCl (pH 3.50) as a background electrolyte, separation voltage 18 kV (negative polarity) and direct detection at 200 nm for brominated substrates. The temperature of capillary was in both cases 25 °C. The method is rapid, able to be automated, and requires only small amount of sample and substrates.

By means of the method basic kinetic parameters of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT 26 were studied: pH and temperature optima and an approximation of the Michaelis constant. The possibility of monitoring the enzyme purification process was also tested. While the method was developed for determination of activity of haloalkane dehalogenase acting on haloaliphatic compounds, it could be used to monitor the activities of other dehalogenating enzymes.

*This work was supported in part by grant 203/97/P149 from the Czech Grant Agency and by the grant ME276 for Czech-Japanese collaboration from the Ministry of Education of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Fetzner S.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 663 (1998).
2. Hardman D. J.: Crit. Rev. Biotechnol. 11, 1 (1991).
3. Belkin S.: Biodegradation 3, 229 (1992).
4. Fetzner S., Lingens F.: Microbiol. Rev. 58, 641 (1994).
5. Iwasaki I., Utsumi S., Ozawa T.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 25, 226 (1952).
6. Bergmann J. G., Sanik J.: Anal. Chem. 29, 241 (1957).
7. Shaw K. W., Lee H., Trevors J. T.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 69, 1494 (1997).
8. Saber D. L., Crawford R. L.: Appl. Environ. Microbiol. 50, 1512 (1985).
9. Schanstra J. P., Rink R., Pries F., Janssen D. B.: Protein Express. Purif. 4, 479 (1993).
10. Brunner W., Staub D., Leisinger T.: Appl. Environ. Microbiol. 40, 950 (1980).

11. Holloway P., Trevors J. T., Lee H.: J. Microbiol. Methods 32, 31 (1998).

## 27 MOBILITA IZOAMYLÁZ U SCHWANNIOMYCES V AGAROVOM GÉLI

JOZEF AUGUSTÍN

*Katedra mlieka, tukov a hygieny požívatin, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

V rámci riešenia problematiky sledovania rôznych druhov mikroorganizmov na ich schopnosť utilizovať škrob, čo je vlastnosťou u viacerých organizmov pomerne známou a je považovaná za jeden z uznaných rozlišovacích taxonomických znakov, bola táto špecifická vlastnosť sledovaná aj vo vybranom súbore kvasiniek a kvasinkovitých organizmov. Je známe, že škrob, ale i ďalšie polysacharidické zložky, ako najdostupnejšie alfa-1,4 glukány sú z hľadiska taxonomickej diferenciacie dostatočne využívané. V tejto práci bola sledovaná mobilita izoamyláz kvasničných izolátov rodu *Schwanniomyces* v elektromagnetickom poli a bola porovnávaná s mobilitou ďalších kvasničných amyláz, ako napríklad *Endomycosis capsularis*, *E. biospora*, *Leucosporidium capsuligenum*, *Cryptococcus luteolus*. Ďalej bola porovnávaná s amylázami bakteriálneho pôvodu *Bacillus amyloliquefaciens* a *B. subtilis*, ako aj s amylázou rastlinného pôvodu pletivovej kultúry smreka obyčajného (*Picea excelsa*).

Alfa-amyláza bola rozdelená elektroforézou v agarovom géli (BACTO-DIFCO) pri pH 8,4. K analýze izoenzymov alfa-amylázy bola použitá chromolytická metóda, využívajúca techniku rovnomerného prevrstvenia elektroforeogramu po separácii izoenzymov vrstvou jemne sieťovaného škrobu s kovalentne viazaným farbivom Remazol Brilliant Blue, privádzaným do reakcie z druhej gélovej vrstvy, tzv. sendvičovým spôsobom. Po inkubácii sa táto detekčná vrstva odstránila a vrstva pôvodne elektroforetická sa zafarbila roztokom jodu. Po detekcii bolo možné izoamylázy pozorovať ako jasné pruhy na tmavom pozadí. Prítomnosť alfa-amylázovej aktivity je teda považovaná za jeden zo základných diagnostických znakov u rôznych mikroorganizmov, nevynímajúc testované druhy rodu *Schwanniomyces*, aj keď špecifická aktivita produkcie (aktivita vzťahnutá na jednotku biomasy) je značne variabilná. Dosiagnuté výsledky elektroforetických štúdií poukazujú na skutočnosť, že jednotným taxonomickým znakom druhu *Schwanniomyces occidentalis* je jedna pomalšie putujúca frakcia, na rozdiel od ostatných testovaných druhov rodu *Schwanniomyces*. Pre druhy *S. alluvius*, *S. castelli* a *S. personii* je práve charakteristická prítomnosť jednej rýchlejšie putujúcej zóny. U dvoch kmeňov *S. occidentalis* a to CCY 47-1-5 a CCY 47-1-10 sa prejavilo anomálne zdvojenie hybridného typu, obsahujúceho oba izoenzymy alfa-amylázy, teda ako pomalšie anodicky putujúcu frakciu, tak aj rýchlejšie putujúcu frakciu, čo je práve charakteristickým znakom niektorých zástupcov rodu *Schwanniomyces*.

*Táto práca bola vypracovaná v rámci riešenia výskumných úloh za podpory grantu č. 1/6228/9 ev. č. A-4890, ktorý poskytl GA VEGA.*

## 28 THE LACTATE DEHYDROGENASE (LD) PATTERN IN SERUM OF CALVES WITH TOTAL ARTIFICIAL HEART (TAH) SAMPLED DURING “ADAPTATION” TO TAH

JAN ŠALPLACHTA and JIŘÍ NEČAS

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

To identify “mean LD pattern” in serum of calves having no heart ventricles after total artificial heart (TAH) implantation, data file was created from LD patterns in serum of experimental calves ( $n = 12$ ) showing no noticeable acute damage and LD pattern oscillation in the serum. Blood serum was sampled during the interval of days 33–49 with TAH. We presumed that a certain adaptation to the TAH occurred within the interval of days 30–50 of survival with TAH as the calves recovered from surgery and no pathophysiological processes were seen yet. Isoenzyme LD patterns in serum from experiments (calves: Amur, Armand, Arvid, Hakon, Marcel, Měšek, Lena, Leon, Norman, Olaf, Prokop, Richard) were used to compute a “mean LD pattern” and its resultant vector. The next step was to compare LD patterns in control serum ( $n = 12$ ) and LD pattern in serum of calves with TAH. Both LD patterns in serum (control and “mean LD pattern”) differed significantly (two-tailed F-test and Student’s t-test,  $p < 0.05$ ) in single LD isoenzymes and resultant vectors. Isoenzyme LD patterns were converted to the vectors of translation model tSV, LD

(1–5) under conditions stated in Ref.<sup>1</sup> The point of intersection of axes  $x, y$  is the end point of the translation vector that represents “mean LD pattern”. While the comparison of both LD patterns by variables of single isoenzymes offered negligible differences, the clear difference between vectors of LD patterns has been shown in the translation model tSV5, LD (1–5) (Fig. 1). The vector of “mean LD pattern” is equipped with rectangle and its corner points are defined by the equations:  $SV[x] \pm 2s_{[x]}$ ;  $SV[y] \pm 2s_{[y]}$ . A rectangle area contains an end point of resultant vector whose LD pattern is in the reference interval with a 95 % probability. To decipher the change in serum LD pattern after TAH implantation, the end points of vectors of mean LD patterns in tissues of controls are completed in Fig. 1. In conclusion, the presented procedure enabled an easy comparison of two files of LD patterns in contrast to single LD isoenzyme evaluation. It was shown that LD patterns in serum of calves with TAH sampled during “adaptation” to TAH and intact controls differed significantly.

## REFERENCES

- Šalplachta J.: Clin. Chim. Acta 259, 51 (1997).

## 29 STUDIUM TKÁŇOVÉ DISTRIBUCE ENZYMŮ KETOGENESE A KETOLÝZY NA AUTOMATICKÉM SPEKTOFOTOMETRU COBAS FARA

JANA HRDÁ a EVŽENIE POSPÍŠILOVÁ

Ústav dědičných metabolických poruch VFN, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2

Cílem studie je zmapovat dosud nedostatečně popsany metabolismus ketonových látek na úrovni enzymů. V jednotlivých tkáních jsou v závislosti na charakteru a metabolické činnosti jejich buněk exprimovány různé enzymy. Enzymy jsou v buňkách přítomny v cytosolu nebo jsou vázány na buněčné struktury. Tkáňová distribuce enzymů je již dlouho známa a patří k důležitým diagnostickým vodítkům.

Ketogenese a ketolýza jsou sledem biochemických reakcí, při nichž dochází ke vzniku a následné utilizaci ketonových látek (acetoacetát, D-3-hydroxybutyrát a aceton). Ketonové látky jsou zásobním zdrojem energie při vyčerpání buněčné glukosy.

Studie zkoumá tkáňovou distribuci známých enzymů ketogenese a ketolýzy. Vzhledem k omezené dostupnosti lidských tkání byly ke studii použity tkáně laboratorní myši. Enzymové aktivity byly měřeny v tkáňových homogenátech (mozek, játra) a v jejich subcelulárních frakcích (mitochondrie, cytosol). Změřili jsme aktivity těchto enzymů: acetoacetyl-CoA-thiolasy, sukcinyl-CoA:acetoacetát-CoA-transferasy, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-synthasy.

Aktivita ketogenických enzymů – acetoacetyl-CoA-thiolasy a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthasy – byla naměřena v mitochondrii jaterní buňky. Naopak aktivita klíčového enzymu ketolýzy, sukcinyl-CoA:acetoacetát-CoA-transferasy, zde nebyla signifikantní. V mitochondrii mozkových buněk chyběla aktivita 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-syn-

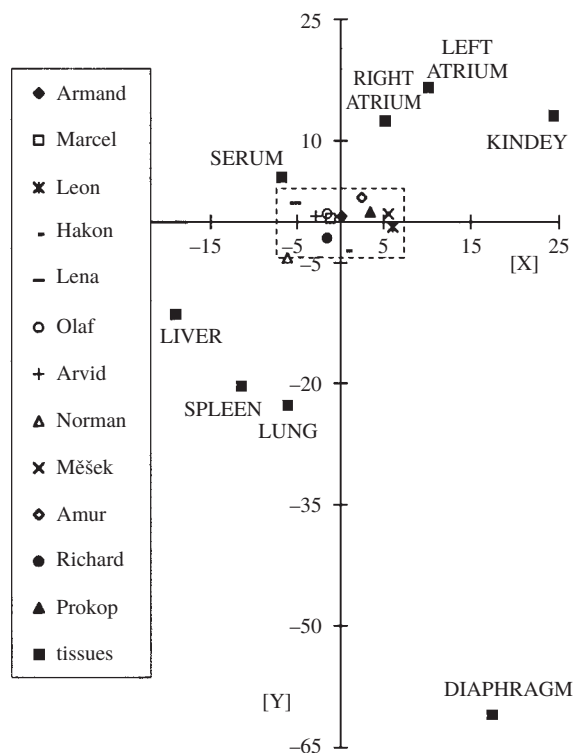


Fig. 1. Isoenzyme LD pattern in serum taken from the calves with TAH; LD pattern in control serum and tissues, translation model tSV5, LD (1–5)



thasy, naměřena byla aktivita acetoacetyl-CoA-thiolasy a sukcinyl-CoA:acetoacetát-CoA-transferasy.

Naše výsledky potvrzují, že ketogenese a ketolýza jsou na subcelulární úrovni vázány na stejnou buněčnou strukturu – mitochondrii. Metabolická dráha ketogenese je lokalizována v jaterní buňce, zatímco ketolýza probíhá v buňce mozkové.

Autoři děkují za finanční podporu grantu IGA MZ NE 6003-3/2000-05-02.

### 30 EFFECT OF VITAMIN E AND SELENIUM INJECTION ON BLOOD GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN SHEEP

GABRIEL KOVÁČ, KHALED MILAD,  
and PAVOL MUDRŇ

University of Veterinary Medicine, Komenského 73, 041 81  
Košice, Slovak Republic

Vitamin E and selenium are antioxidants that have been related to immune function in domestic animals<sup>1</sup>. Selenium as an essential component of glutathione peroxidase reduces potentially harmful oxygen radical such as hydrogen peroxides and lipid hydroperoxides<sup>4</sup>. The present investigation aimed to determine the effects of vitamin E and selenium administration on blood glutathione peroxidase activity in sheep.

Twelve pregnant Merino sheep weighing 42 to 66 kg, aged three to four years, were available for the present experiment. The sheep were housed and fed daily concentrates of 0.5 kg BAK (BAK is a concentrate for sheep), meadow hay and water were available *ad libitum*. The same feeding program continued throughout the experiment duration, and the sheep were under a constant surveillance during the experiment. The sheep were divided into two groups. The first group was given a single subcutaneous injection of 5 mg tocopheryl acetate and 0.4 mg of selenium as sodium selenite per kg body weight (Selevit inj: 25 mg tocopheryl acetate and 2.2 mg sodium

selenite in 1 ml, Biotika) and the second group served as control. Blood samples were obtained at the beginning of the experiment prior to vitamin E and selenium administration, 14 days after lambing and 30 days after lambing. The glutathione peroxidase activity in whole blood was estimated according to the modification of the technique of Paglia and Valentine<sup>3</sup> using a commercial kit (Randox – Ireland). Data were analysed by a two way analysis of variance. Student's t-test was used.

The whole blood GSH-Px activities of treated group with vitamin E and selenium preparation and control group are presented in Table I. GSH-Px assays offer a rapid and simple alternative to whole blood selenium estimation for the diagnosis of selenium deficiency, avoiding the matter of selenium concentration. The enzyme is very stable in erythrocytes<sup>5</sup> and it is therefore suitable for routine diagnostic purposes. In treated group, the GSH-Px increase appears to respond to selenium and vitamin E injection. The decline in selenium concentration during late pregnancy and lactation has already been reported for selenium-deficient sheep<sup>2</sup>. The present study demonstrated that sheep of control group, lactation was probably responsible for worsening the GSH-Px activity status. Therefore, our study demonstrated that dose used before lambing was responsible for a lasting increase in the GSH-Px activity. Thus, the sheep of this experiment were possibly stressed. In conclusion, a single vitamin E and selenium injection led to a significant increase in whole blood GSH-Px activity and the increase was similar after lambing (14 and 30 days).

#### REFERENCES

1. Finch J. M., Turner R J.: Res. Vet. Sci. 60, 97 (1996).
2. Lacetera N., Bernabucci U., Ronchi B., Nardone A.: Vet. Res. 30, 363 (1999).
3. Paglia D. E., Valentine W. N.: J. Lab. Clin. Med. 70, 158 (1967).
4. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson D.G., Hafeman D. G., Hoexstra W. G.: Science 179, 588 (1973).
5. Wilson P. S., Judson G. J.: Br. Vet. J. 132, 428 (1976).

Table I

Whole blood glutathione peroxidase activity in treated sheep with vitamin E and selenium and in non-treated sheep

Groups	GSH-Px activity (U.g <sup>-1</sup> HB)			Time effect (p) Group effect (p)
	Before treatment (0 day)	After parturition		
		(14 days)	(30 days)	
Treated	49.05±17.78	226.6±82.57 <sup>a,b</sup>	216.6±40.09 <sup>a,c</sup>	p<0.0001
Control	49.68±22.97	50.22±20.14	42.70±16.73	p<0.0001

<sup>a</sup> p<0.01 vs 0; <sup>b</sup> p<0.01 vs C; <sup>c</sup> p<0.001 vs C

## 01 EXPRESE SACHARIDOVÝCH MOLEKUL NA POVRCHU LIDSKÝCH NORMÁLNÍCH LEUKOCYTÁRNÍCH BUNĚK A JEJICH PATOLOGICKÝCH PROFILŮ

KRISTIÁN KOUBEK<sup>a</sup>, BEFEKADU ASFAW<sup>b</sup>  
a JANA LEDVINOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav hematologie a krevní transfúze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2, <sup>b</sup>Ústav dědičných metabolických poruch, Karlova univerzita, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2

Standardní biotechnologií přípravy monoklonálních protilátek (MoAbs) byly konstruovány tři hybridomy produkující MoAbs (MG-1, MG-2, MG-7) prokazující sacharidové molekuly vázané na membrány lidských leukocytů.

1. MoAb MG-1 (UHKT) je třídy IgM a prokazuje obecný terminální pentasacharid Gal(β1→4)-(Fucα1→3)-GlcNAc-R některých membránových glykoproteinů a glykolipidů. Tato molekula je označována jako Lewis<sup>X</sup>, X-hapten, lacto-A-fucopentaose III nebo stádiově specifický embryonální antigen (SSEA) (cit.<sup>1</sup>). CD15 znak je vyjádřen na nezralých buňkách kostní dřeni a leukemických buňkách myelo-monocytární řady, čímž napomáhá k imunofenotypizaci některých myeloidních typů leukemií. Na základě exprese CD34 a CD15 znaků na leukemických buňkách je možné tyto buňky *in vitro* odstranit z preparátu v complement zprostředkované reakce za použití anti CD15 MG-1 MoAb od normálních hematopoetických progenitorových buněk (CD34+). Mimo to defekt – jehož příčinou je mutace v genu kódujícím jeden z enzymů fukosyltransferasy, která se podílí na biosyntéze sialyl-Le<sup>X</sup> (CD15) – je nazýván LAD II (leukocyte adhesion deficiency). Tento klinický syndrom, zřejmě v důsledku poruch biosyntézy neuronálních gangliosidů, způsobuje u nemocných i mentální retardaci.

2. MoAb MG-2 (UHKT) prokazuje CDw17 molekulu (laktosylceramid). Jedná se o karboxyhydrátový antigen definovaný jako laktosyl-disacharidová skupina glykosfingolipidu laktosylceramidu (LacCer): Galβ1-4GlcβCer (1-3) (cit.<sup>2</sup>).

Tato molekula se vyskytuje na některých buňkách myeloidní řady, B lymfocytech (40–75 %) a také na některých leukemických buňkách převážně nemocných s akutními myeloidními leukemiemi. Funkce CDw17 antigenu není zatím plně objasněna. Z vazby tohoto antigenu na bakterie se předpokládá, že CDw17 může hrát roli při fagocytóze. Mimo to se tato molekula může podílet v odpovědi buněk na fytohemaglutinin i IL-2 a také při vzniku některých dědičných defektů (např. deficit prosaposinu).

3. MoAb MG-7 (UHKT) reaguje s NK buňkami (50 %) a s IL-2 aktivovanými NK buňkami. Dále MG-7 protilátka reaguje s buňkami FS12.3 fibrosarkomové linie, THP-1 monocytární linie, s NK.3 linií a s buňkami některých dalších lymfoblastoidních linií (APD, BSM, Daudi, RSH) (cit.<sup>3</sup>).

MoAb MG-7 nereaguje s cyCD3ε thymocyty (zbytkovými nebo IL-2 aktivovanými) a rovněž tak i s buňkami transfektovanými geny kódujícími CD94 a CD161 (NKR-P/A) znaky. Z výsledků autorů A. H. Korosové (Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh) prováděné v rámci mezinárodních studií (6. workshop a konference o lidských leukocytárních diferenciacních antigenech) vyplývá, že MG-7 MoAb reaguje také s buňkami linie malobuněčného plicního karcinomu (9–67 %) a karcinomu mammy (41–77 %) (cit.<sup>4</sup>).

Dále autoři Berti a spol. (Institute of Dermatological Science, University of Milan) našli reakci této protilátky s bílou a šedou pulpou sleziny a také s krevními cévami a makrofágy<sup>4</sup>. Konečně B. Kniep (Institute of Immunology, University of Technology, Dresden) uzavírá, že MG-7 MoAb se specificky váže na neutrální glykolipid globo-tetra-osylceremidu (globosid = P antigen), což je hlavní glykosfingolipid erytrocytární membrány<sup>4</sup>.

Tato práce vznikla v rámci řešení grantů IGA MZ ČR č. 3747, Ligy proti rakovině (4/2000, Praha), FRVŠ č. 1899/2000 a GA UK č. 37/2000.

## LITERATURA

1. Kannagi R., v: *Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens* (Kishimoto T., Kikutani H., von dem Borne A., Goyert S. M., Mason D. Y., Miyasaka M., Moretta L., Okumura K., Shaw S., Springer T. A., Sugamura K., Zola H., ed), str. 348. Garland Publishing, Inc., 1997.
2. Goyert S., v: *Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens* (Kishimoto T., Kikutani H., von dem Borne A., Goyert S. M., Mason D. Y., Miyasaka M., Moretta L., Okumura K., Shaw S., Springer T. A., Sugamura K., Zola H., ed), str. 971. Garland Publishing, Inc., 1997.
3. L. Moretta, v: *Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens* (Kishimoto T., Kikutani H., von dem Borne A., Goyert S. M., Mason D. Y., Miyasaka M., Moretta L., Okumura K., Shaw S., Springer T. A., Sugamura K., Zola H., ed), str. 265. Garland Publishing, Inc., 1997.
4. Poggi, Costar P., v: *Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens* (Kishimoto T., Kikutani H., von dem Borne A., Goyert S. M., Mason D. Y., Miyasaka M., Moretta L., Okumura K., Shaw S., Springer T. A., Sugamura K., Zola H., ed), str. 317. Garland Publishing, Inc., 1997.

## 02 STEREOCHEMISTRY OF GLYCOSIDIC BOND HYDROLYSIS BY *THERMOMYCES LANUGINOSUS* α-GALACTOSIDASE

VLADIMÍR PUCHART, MÁRIA VRŠANSKÁ,  
and PETER BIELY

*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic*

Glycosyl hydrolases fall into two major mechanistic categories: those which hydrolyze the glycosidic bond with net inversion of anomeric configuration ( $\alpha \rightarrow \beta$ ,  $\beta \rightarrow \alpha$ ) and those which do so with net retention of anomeric configuration ( $\alpha \rightarrow \alpha$ ,  $\beta \rightarrow \beta$ ) (Ref.<sup>1</sup>). Structurally similar enzymes that may show different substrate specificity usually have the same catalytic mechanism resulting in that they are all retaining or inverting ones<sup>2</sup>.

An interesting  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22), belonging probably to family 27 of glycosyl hydrolases, was purified in our laboratory from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Stereochemistry of glycosidic bond hydrolysis of this  $\alpha$ -galactosidase was studied by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. 4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-galactopyranoside and D-mannopyranosyl- $\beta$ -1,4-D-mannopyranosyl- $\beta$ -1,4-(6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-D-mannopyranose were chosen as representatives of artificial and naturally occurring substrates, respectively. The amount of the enzyme used in the NMR experiment was selected to assure such a rate of substrate hydrolysis which would exceed the rate of mutarotation of released galactose. With both substrates primary product of hydrolysis was  $\alpha$ -D-galactopyranose which consequently underwent slow mutarotation to its  $\beta$ -anomer which is predominant in anomeric equilibrium. This means that *T. lanuginosus*  $\alpha$ -galactosidase is a retaining glycosyl hydrolase acting via double replacement mechanism. In consonance with this fact the enzyme is able to catalyze transglycosylation reactions at high substrate concentration. This leads to a suggestion that in the enzyme catalytic center the most important amino acids are two carboxylate residues, most probably a pair of glutamates, that function as acid/base catalyst and nucleophile, and that a covalently linked  $\beta$ -D-galactopyranosyl-enzyme intermediate is involved in the reaction mechanism.

## REFERENCES

1. Withers S. G.: Pure Appl. Chem. 67, 1673 (1995).
2. Henrissat B., Bairoch A.: Biochem. J. 293, 781 (1993).

### 03 CHANGES OF SOME CARBOHYDRATE DEGRADING ENZYMES DURING INHIBITION OF ELONGATION GROWTH CAUSED BY GALACTOGLUCOMANNAN-DERIVED OLIGOSACCHARIDES

LADISLAV BILISICS<sup>a</sup>, JOZEF VOJTAŠŠÁK<sup>a</sup>, PETER CAPEK<sup>a</sup>, DESANA LIŠKOVÁ<sup>a</sup>, DANIELA KÁKONIOVÁ<sup>a</sup>, KARIN SADLOŇOVÁ<sup>a</sup>, and JÁN STANO<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, <sup>b</sup>Garden of Medicinal Plants, Faculty of Pharmacy CU, 832 32 Bratislava, Slovak Republic

In our previous papers<sup>1,2</sup> the inhibition effect of galactoglucomannan-derived oligosaccharides (GGMOs) on elongation growth of pea stem segments has been described. Activity and distribution changes of some carbohydrate degrading enzymes – glycanases (endo-(1,4)- $\beta$ -D-mannanase, endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase, and endo-(1,4)(1,3)- $\beta$ -D-glucanase) and glycosidases ( $\beta$ -D-glucosidase,  $\beta$ -D-mannosidase,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinosidase, and  $\alpha$ -D-galactosidase) in different cell fractions – extracellular, soluble and cell wall fraction (divided into “TRIS soluble”, “LiCl soluble”, “EDTA extractable”, and nonextractable – cell wall bound) occurred during this process.

The main portion of glycosidases were present in the

“soluble” fraction, while glycanases were present in the “cell wall” fraction. The presence of 2,4-D and GGMOs in the incubation mixture increased  $\alpha$ -D-galactosidase activity in the “soluble” fraction and decreased endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase activity in the “cell wall” fraction compared with the 2,4-D control. These results, as well as the finding that  $\alpha$ -D-galactopyranosyl residues are essential for the biological activity of GGMOs, indicate significant role of these enzymes in the elongation growth. The biochemical mechanism of this process is probably realized on two levels: 1) on the level of the soluble fraction where the changes of  $\alpha$ -D-galactosidase activity led to changes of the biological activity of GGMOs through their modification in the  $\alpha$ -D-galactopyranosyl content, and 2) in the cell wall where the changes of endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase activity led to endolytic changes of cellulose chain resulting in changes of the growth rate.

This work was supported by the VEGA grant No. 2/5061/00.

## REFERENCES

1. Auxtová O., Lišková D., Kákoniová D., Kubačková M., Karácsonyi Š., Bilisics L.: Planta 196, 420 (1995).
2. Auxtová-Šamajová O., Lišková D., Kákoniová D., Kubačková M., Karácsonyi Š., Bilisics L.: J. Plant. Physiol. 147, 611 (1996).

### 04 INDUCTION OF PLANT DEFENCE RESPONSE BY GALACTOGLUCOMANNAN-DERIVED OLIGOSACCHARIDES

LUDMILA SLOVÁKOVÁ<sup>a</sup>, DESANA LIŠKOVÁ<sup>b</sup>, PETER CAPEK<sup>b</sup>, MARTA KUBACKOVÁ<sup>b</sup>, DANIELA KÁKONIOVÁ<sup>b</sup>, and LADISLAV BILISICS<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Experimental Phytopathology and Entomology, Slovak Academy of Sciences, Nádražná 52, 900 28 Ivanka pri Dunaji, <sup>b</sup>Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic

Over the last decade, more attention has been focused on biological active oligosaccharides (oligosaccharins) because these fragments released from cell wall polymers can function in plants as molecular signals affecting growth, development, and defence or they can be involved directly in some physiological processes.

In our previous work<sup>1</sup> we have described the biological effect of galactoglucomannan-derived oligosaccharides (GGMOs) in elongation growth, in some morfogenic processes, and on vitality of regenerating protoplasts. Now, we report the results of defence response of cucumber (*C. sativus* cv. Laura) infected by tobacco necrosis virus (TNV) in the presence of GGMOs isolated from secondary cell walls of spruce (*Picea abies* L. Karst). In this model system cucumber reacted hypersensitively to TNV infection with formation of local lesions.

Application of GGMOs of different degree of polymerization and concentration onto plant cotyledons resulted in the inhibition of disease symptoms from 60 % to 75 %. Average

lesion number per cotyledon was significantly decreased when GGMOs were applied simultaneously or 24 h prior to TNV inoculation. Further, significant changes of PR-proteins (peroxidase, glucanase, and chitinase) acting in hypersensitive response of cucumber cotyledons to TNV inoculation were observed as well.

Galactoglucomannan-derived oligosaccharides from spruce can induce a non specific resistance to local TNV infection in plants. It seems that they act as inhibitors of virus infection rather than inhibitors of direct virus multiplication.

*This research was supported by Slovak Grant Agency for Science No. 2/5061/99 and 2/1010/98.*

#### REFERENCES

1. Lišková D., Kákoniová D., Kubacková M., Kollárová K., Capek P., Bilisics L., Vojtaššák J., Slovákova L.: *Advances in Regulation of Plant Growth and Development* (Strnad M., Pec P., Beck E., ed.), p. 119. Peres Publishers, Prague 1999.

#### 05 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE OLIGOSACCHARIDES

PETER CAPEK, MARTA KUBACKOVÁ,  
JURAJ ALFOLDI, LADISLAV BILISICS,  
DESANA LIŠKOVÁ, and DANIELA KÁKONIOVÁ

*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic*

The discovery that some microbial and plant oligosaccharides released from certain cell wall polysaccharides are biologically active in many life processes (growth, development, and defence) of plant cell initiated a new area of plant biology<sup>1</sup>. We have found that oligosaccharides isolated from spruce (*Picea abies* L. Karst) cell wall polymer galactoglucomannan showed biological effect as well<sup>2</sup>.

Alkali-extracted galactoglucomannan from spruce sawdust composed of D-galactose, D-glucose, and D-mannose in 1:8:33 mole proportion was partially depolymerized and the hydrolysate mixture was separated by gel filtration to nine distinct oligosaccharide fractions of d.p. 2–10. Compositional analysis of oligosaccharides revealed the presence of D-galactose, D-glucose, and D-mannose in different mole ratio with dominant content of D-mannose. With increasing d.p. of oligomers the content of D-galactose increased while the content of D-mannose decreased. The major components of this hydrolysate were oligomers of d.p. 2, 3, and 4. HPLC chromatography showed their heterogeneous character. In order to determine the number, mutual ratio, and detailed structural features of the individual components, the oligomeric fractions of d.p. 2, 3, and 4 were separated by a combination of HPLC chromatography and PPCH. The structures of the homogeneous components were elucidated on the basis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C measurements (2D DQF-COSY, TQF-COSY, 1D-TOSCY, HSQC, and HMBC) and chemical analyses.

*This research was supported by Slovak Grant Agency for Science No. 2/5061/99.*

#### REFERENCES

1. Albersheim P., Darvill A. G., Augur Ch., Cheong J. J., Eberhard S., Hahn M. G., Marfá V., Mohnen D., O'Neill M. A., Spiro M. D., York W. S.: *Acc. Chem. Res.* 25, 77 (1992).
2. Lišková D., Kákoniová D., Kubacková M., Kollárová K., Capek P., Bilisics L., Vojtaššák J., Slovákova L.: *Advances in Regulation of Plant Growth and Development* (Strnad M., Pec P., Beck E., ed.), p. 119. Peres Publishers, Prague 1999.

#### 06 STRUCTURE OF AN EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM THE YEAST *CRYPTOCOCCUS LAURENTII*

PETER CAPEK, MÁRIA MATULOVÁ,  
PETER BARTEK, and NADEZDA KOLAROVA

*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, Slovak Republic*

*Cryptococcus laurentii* was a zoopathogenic yeast-like organism but recently was found that it can be a human pathogen as well. In addition to forming capsules, excretes extracellular polysaccharides into growth medium which play an important role in infection<sup>1</sup>. From this point of view it was interesting to characterize the individual components of this extracellular mixture.

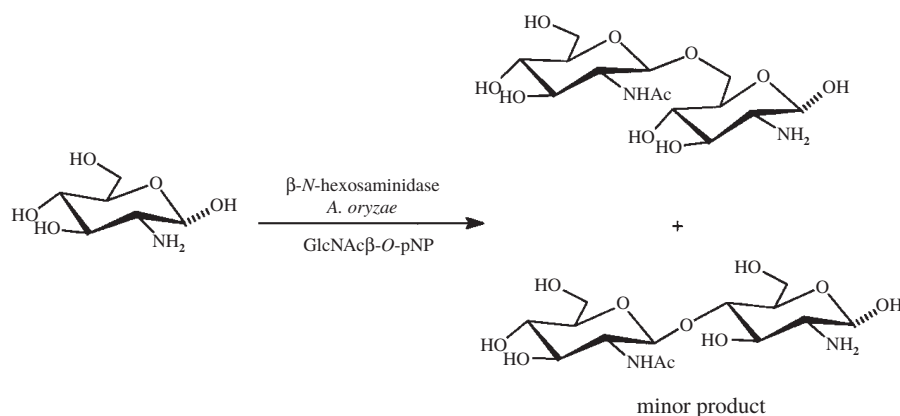
A mixture of extracellular polysaccharides composed of D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-xylose, and D-glucuronic acid was dissolved in water and precipitated with Fehling's solution. The insoluble part afforded the glucomannan-protein complex already described<sup>2</sup> and the soluble portion was resolved by ion-exchange chromatography to neutral and acidic fractions. The neutral portion was further purified by size-exclusion chromatography to give a homogeneous polysaccharide composed of D-glucose, D-xylose D-galactose, and D-mannose, in 1.0:1.4:3.7:10.8 mole proportion. Partial acid hydrolysis and acetolysis of galactoglucoylomannan afforded mixtures of oligomers which were separated by gel filtration to four distinct oligosaccharide fractions of d.p. 2–5. The structures of seven dimers, four trimers, two tetramers, and two pentamers were elucidated on the basis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C measurements and chemical analyses.

*This research was supported by Slovak Grant Agency for Science No. 2/7137/20 and 2/5061/20.*

#### REFERENCES

1. White C. W., Jacobson E. S.: *Can. J. Microbiol.* 39, 129 (1992).
2. Kolarova N., Matulová M., Capek P.: *J. Carbohydr. Chem.* 16, 609 (1997).





Schema

## 07 ENZYMATIC SYNTHESIS OF CHITOLIGOSACCHARIDES CONTAINING VARIOUS N-ACYL GROUPS

PAVLA FIALOVÁ, EVA RAJNOCHOVÁ,  
 ZDENKA HUŇKOVÁ, LENKA WEIGNEROVÁ,  
 and VLADIMÍR KŘEN

*Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation,  
 Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083,  
 142 20 Prague 4, Czech Republic*

Oligosaccharides play an important role in many aspects of immune recognition. Chitooligomer derivatives are important activating ligands for natural killer cells (NK). This activity is strongly dependent on some structural features such as type of linkage between the glycosidic moieties and type of substituent at the NH groups. The aim of our project was to investigate the immunomodulatory properties of chitooligo-

mers modified at the reducing end, in particular those bearing one free amino group. This arrangement offers the possibility of introducing various acyl groups into 2-N position and to examine the influence on the binding properties to the NK cell receptor.

2-Deoxy-2-glucopyranosylamine HCl was subjected to glycosyl transfer using GlcNAc $\beta$ -O-pNP as a glycosyl donor (Schema) at pH 5.0 and 37 °C and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*. Reaction was monitored by TLC. The main product was GlcNAc $\beta$ (1-6)GlcNH<sub>2</sub> as could be seen from the NMR spectrum but also traces of GlcNAc $\beta$ (1-4)GlcNH<sub>2</sub> regioisomer was isolated. Surplus GlcNH<sub>2</sub>·HCl was used to prevent the parasitic reaction of two GlcNAc $\beta$ -O-pNP molecules giving yield to chitobiose and/or pNP-chitobiose. The pure product was isolated by gel filtration on the column packed with Toyopearl HW-40F eluted with water.

*Support by a Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 303/99/1382 is gratefully acknowledged.*

## 01 THE MEMBRANE $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ecto-ATPase (“MYOGLEIN”): AN UPDATE

ATTILA ZIEGELHÖFFER<sup>a</sup>, ALBERT BREIER<sup>b</sup>,  
and N. S. DHALLA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Bratislava,* <sup>b</sup>*Institute of Molecular Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic,* <sup>c</sup>*Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Manitoba Winnipeg, Canada*

This paper basically reviews the important data on  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase with particular emphasis on the enzyme present in the myocardium.  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase also has been referred to as  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase with low affinity to  $\text{Ca}^{2+}$  ions,  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ATPase, basal ATPase or “myoglein”. It was first defined in 1957 in liver tissue, than in 1971 in the myocardium, identified as a membrane-bound enzyme and it was classified with the number E.C.3.6.1.15 as an E-type ATPase.

Most important features of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase or “myoglein” are:

1. Catalytic site situated on the extracellular surface;
2. Difference in response or even insensitivity to some inhibitors of other ATPases such as: *a*) Ouabain ( $1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) and vanadate ( $50 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) known as specific inhibitors of P-type ion transporting ATPases (the Na, K-ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -pump ATPases of the SL and SR etc.); *b*)  $\text{NaN}_3$  ( $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) and oligomycin ( $6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) – inhibitors of F-type ATPases ( $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase, etc.); *c*) *N*-ethylmaleinide (NEM,  $0.5 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) and fluoride ( $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) known inhibitors of V-type ATPases (vacuolar proton pump, etc.);
3. Inactivation by non-ionic detergents;
4. Absence of phosphoprotein intermediate formation during the reaction cycle;
5. Low affinity to its metallic cofactors  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ( $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ) in contrary to the  $\text{Ca}^{2+}$  pump ATPases with affinities to  $\text{Ca}^{2+}$  ions approaching ( $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ );
6. High specificity for nucleotide triphosphates, particularly to ATP, low nucleotide diphosphate and monophosphate splitting;
7. Absence of an essential SH group in the ATP binding site – in contrary to all P-type ATPases;
8. High turnover rate of  $5000,000 \text{ min}^{-1}$ ;
9. Alkaline pH optimum (7.5–8.5);
10. Low abundance in most tissues;
11. Activation upon electrical stimulation;
12. Activation upon cAMP-dependent phosphorylation of membrane proteins.

Based on its functional properties and the mode of its regulation in cell membranes of different tissues,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase may act in the following roles:

1. As a receptor for ATP and ADP involved in:
  - a*) Transmission of purinergic signals by binding of nucleotides to  $\text{P}_2\text{Y}$  purinoreceptors;
  - b*) Participation in the cascade of extracellular ATP-induced protein phosphorylation in smooth muscle cells;
  - c*) Serve as a receptor and simultaneously also as

an adhesion protein in axo-glyal recognition and in axo-glyal contact formation.

2. In induction of NO release in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. This was confirmed by complete suppression of NO formation due to inhibitors of adenylate kinase and  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase.
3. Serve as a biochemical correlate to the electrophysiologically defined  $\text{Ca}^{2+}$  channel in heart sarcolemma.
4. In bicarbonate transport in pancreatic cells.
5. In nutrient breakdown in the rat small intestine brushborder membrane.
6. As a cell adhesion molecule named “myoglein”, in cells of numerous tissues including the myocardium. Cardiac myoglein exhibits 100 % homology with the mouse platelet adhesion protein as well as 88–96 % homology with other cell adhesion proteins.
7. In protection of  $\text{L}_0\text{V}_0\text{D}_x$  human tumor cells against death caused by exogenous ATP.
8. An increase in the mercurial-sensitive form of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase/C-CAM always indicates an increased expression of carcinoembryonic antigen.
9. In stabilization and protection the membranes of the Langerhans cells, submandibular gland cells and taste bud cells against the membrane-lytic effect of exogenous ATP as well as in preservation of their cell adhesion and secretory properties.

## 02 INTERACTION OF ISOTHIOCYANATES WITH ATP BINDING SITE OF SODIUM PUMP – ESSENTIAL ROLE OF CYSTEINE

ALBER BREIER<sup>a</sup>, ATTILA ZIEGELHÖFFER<sup>b</sup>,  
PETER DOČOLOMANSKÝ<sup>a</sup>, and VIERA BOHÁČOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovakia,* <sup>b</sup>*Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava, Slovak Republic*

( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPase (sodium pump, a member of P-type ATPases) is generally known to secure the active transport of sodium and potassium ions across plasma membrane and is involved in regulation of several processes in cells<sup>1-4</sup>. Isothiocyanates are recognized inhibitors acting at ATP-binding site of this enzyme<sup>5</sup>. Detailed study with modification of proteins in molecules of purified sodium pump by fluorescein isothiocyanate (FITC) and consequent tryptic hydrolysis followed with isolation and sequencing of the respective peptide fragments revealed FITC bound to a lysine residue<sup>6</sup>. This residue was then suggested to be essential for interaction of ATP with the ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPase. Nevertheless, upon an exchange by site directed mutagenesis of the lysine, believed to be essential, the expected total inhibition of ATPase activity was missing<sup>7</sup>. In addition, in plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (another member of the P-type ATPases), the residual activity was shown to be still sensitive to FITC (Ref.<sup>8</sup>). On the contrary, in our previous studies we have shown on the basis of reactivity of isothiocyanates the primary target of FITC in ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPase has to be the SH group of a cysteine residue<sup>9-12</sup>. However, because the SH groups are forming relatively unstable products with

isothiocyanates, i.e., S-esters of dithiocarbamic acid, that may dissociate rapidly namely under altered conditions during trypsinolysis and sequencing procedure, the FITC may be transferred from its original site of interaction to a lysine residue and this may lead to final identification of the label on a false place.

This work was supported by VEGA SR 2/6086/20.

## REFERENCES

1. Obšil T., Merola F., Lewit-Bentley A., Amler E.: *Gen. Physiol. Biophys.* 17, *Suppl. 1*, 52 (1998).
2. Breier A., Sulová Z., Vrbanová A.: *Gen. Physiol. Biophys.* 17, 179 (1998).
3. Sulová Z., Vyskočil F., Stankovičová T., Breier A.: *Gen. Physiol. Biophys.* 17, 271 (1998).
4. Vrbjar N., Bernátová I., Pecháňová O.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, *Suppl. 1*, 6 (1999).
5. Carilli C. T., Farley R. A., Perlman D. M., Cantley L. C.: *J. Biol. Chem.* 257, 5601 (1981).
6. Farley R. A., Tran C. M., Carilli C. T., Hawke D., Shively J. E.: *J. Biol. Chem.* 259, 9532 (1984).
7. Wang K., Farley R. A.: *J. Biol. Chem.* 267, 3577 (1992).
8. Adamo H. P., Filoteo A. G., Penniston J. T.: *Biochemistry* 317, 41 (1996).
9. Ziegelhoffer A., Breier A., Džurba A., Vrbjar N.: *Gen. Physiol. Biophys.* 2, 447 (1983).
10. Breier A., Ziegelhoffer A., Stankovicova T., Docolomansky P., Gemeiner P., Vrbanova A.: *Mol. Cell. Biochem.* 147, 187 (1995).
11. Breier A., Ziegelhoffer A., Famulsky K., Michalak M., Slezak J.: *Mol. Cell. Biochem.* 160-161, 89 (1996).
12. Ziegelhöffer A., Kjeldsen K., Bundgaard H., Breier A., Vrbjar N., Džurba A.: *Gen. Physiol. Biophys.* 19, 9 (2000).

### 03 PITFALLS INHERENT IN MEASURING STRESS-INDUCED CHANGES IN PROTONMOTIVE FORCE IN PROTEOLIPOSOMES RECONSTITUTED FROM THE YEAST PLASMA MEMBRANE

ALEŠ HOLOUBEK<sup>a</sup>, JAROSLAV VEČEŘ<sup>b</sup>,  
and KAREL SIGLER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Microbiology, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4,*  
<sup>b</sup>*Institute of Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic*

Oxidative and other types of stress affect the plasma membrane of cells by inactivating the membrane H<sup>+</sup>-ATPase and thereby dissipating or collapsing the transmembrane protonmotive force and its two components  $\Delta\psi$  and  $\Delta\text{pH}$ . The net effects of stress on  $\Delta\psi$  and  $\Delta\text{pH}$  can be measured without interfering metabolic influences in an *in vitro* membrane system – proteoliposomes reconstituted from lipids such as asolectin, soybean or egg lecithin, and purified fragments of the plasma membrane. In yeasts, such proteoliposomes can be produced by subjecting a mixture of the two components plus a suitable detergent to dialysis<sup>1</sup> or freeze-thaw sonication<sup>3</sup>. The

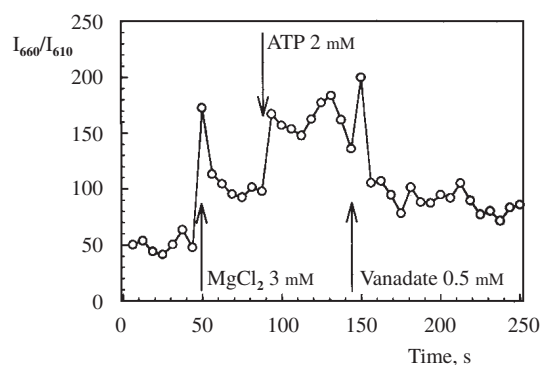


Fig. 1. Measurement of  $\Delta\psi$  in reconstituted yeast (*S. pombe*) plasma membrane proteoliposomes by the fluorescent probe Oxonol VI

two components of the protonmotive force are then measured usually with suitable fluorescent probes (e.g. Oxonol VI)<sup>2</sup>. Acquisition of satisfactory results requires several conditions to be fulfilled: a) the resulting proteoliposomes have to be properly sealed; b) the proton conductance of their membranes has to be sufficiently low to enable the observation of  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\psi$  buildup and stress-induced dissipation; c) the protonmotive force-generating H<sup>+</sup>-ATPase has to remain active throughout the experiment; d) the fluorescent probes used for  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\psi$  measurement must not affect the protonmotive force.

Our measurement of the protonmotive force in proteoliposomes reconstituted from the plasma membrane of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* revealed several pitfalls. One of them is the possible inactivation of the H<sup>+</sup>-ATPase by cellular proteases during proteoliposome preparation. This danger is high with *S. cerevisiae* but relatively low with *S. pombe*. In the measurement of  $\Delta\psi$ , another source of inaccuracies may stem from the fact that, at the ambient pH 6 used with proteoliposomes of small inner volume, the fluorescent  $\Delta\psi$ -indicator probe itself has to be used at very low concentrations (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-8</sup> M) to avoid its dissipating effect on  $\Delta\psi$ . This in turn requires a high-sensitivity fluorimeter.

The measurement of  $\Delta\text{pH}$  in proteoliposomes containing sequestered fluorescent probe requires that the probe used does not perceptibly flow out of the proteoliposomes during the measurement. This condition is not fulfilled with some probes such as SNARF. The  $\Delta\text{pH}$  across the proteoliposome membrane has to be sufficiently stable to permit prolonged measurements.

Despite these pitfalls, the generation of protonmotive force by the membrane H<sup>+</sup>-ATPase on addition of external ATP, and its changes brought about by H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors such as vanadate can be measured in proteoliposomes reconstituted from the yeast plasma membrane (Fig. 1).

The work was supported by CR Grant Agency (grants 202/99/0186, 204/99/0488), CR Ministry of Education (grant ME 315), NATO grant SA (CRG.CRGP 973150) and BMBF grant TSR-113-97.

## REFERENCES

1. Mair T., Höfer M.: *Biochem. Int.* 17, 593 (1988).

- Portele A., Lenz J., Höfer M.: J. Bioenerg. Biomembr. 29, 603 (1997).
- Serrano R.: Methods Enzymol. 157, 533 (1988).

#### 04 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ANTIPORTNÍ MECHANISMY V KVASINKÁCH

OLGA KINCLOVÁ<sup>a,b</sup>, SERGE POTIER<sup>b</sup>  
a HANA SYCHROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika, <sup>b</sup>Laboratory of Microbiology and Genetics, University Louis Pasteur, 28, rue Goethe, 67083 Strasbourg, France

Kvasinky se liší svou odolností vůči vysokým koncentracím alkalických iontů ve vnějším prostředí. Na udržování optimální nízké koncentrace toxického sodíku a lithia v buňkách těchto eukaryontních mikroorganismů se podílejí jak ATPasy tak antiportní přenašeče využívající gradient protonů přes plazmatickou membránu. Geny kódující antiportní přenašeče schopné eliminovat alkalické kovy z buněk byly zatím klonovány ve třech kvasinkách: osmosenzitivní *Schizosaccharomyces pombe* (gen *sod2*), částečně osmotolerantní *Saccharomyces cerevisiae* (gen *NHA1*) a vysoce osmotolerantní *Zygosaccharomyces rouxii* (geny *Z-SOD2*, *Z-SOD22*). Odvozené primární struktury všech tří přenašečů se velmi podobají, pouze C-konec proteinu Nha1p je mnohem delší než u přenašečů z *S. pombe* a *Z. rouxii*. Abychom mohli podrobněji charakterizovat vlastnosti Nha1p, lépe specifikovat jeho úlohu v buňce a objasnit úlohu dlouhého C-konce, byly všechny tři geny klonovány za konstitutivní promotor genu *NHA1* a exprimovány v kvasince *S. cerevisiae*, v kmeni B31 (*enal-4Δ nha1Δ*), který je značně senzitivní k vysokým koncentracím alkalických iontů ve vnějším prostředí. U získaných transformantů byl stanoven limit jejich tolerance vůči různým alkalickým iontům a byla měřena rychlost výstupu Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, a Li<sup>+</sup> z buněk. Získané výsledky ukázaly, že, zatímco exprese přenašečů *sod2* a zejména *Z-Sod2* vede ke značnému zvýšení tolerance buněk k sodíku a lithiu, pouze Nha1p se účastní transportu draslíku. Pomocí zvýšené exprese genu *Z-SOD2* v divokých kmenech *S. cerevisiae* byla testována také možnost zlepšení tolerance *S. cerevisiae* k sodíku a lithiu.

Tato práce byla podporována grantem GA ČR 204/98/0475.

Table I

Mean S100A1 densities (immunogold particles/mm<sup>2</sup>) and the values normalized to immuno-labelling in mitochondria (±SEM)

	Sarcoplasmic reticulum	Z-line	I-band	A-band	Mitochondria	Remaining sarcoplasm
Particles/μm <sup>2</sup>	0.783±0.230	0.414±0.136	0.165±0.089	0.096±0.028	0.159±0.070	0.102±0.033
Normalized values	3.316±0.344	1.963±0.115	0.987±0.074	0.813±0.092	–	0.846±0.153

#### 05 S100A1 Ca<sup>2+</sup>-BINDING PROTEIN IN HUMAN HEART. A LOCALIZATION STUDY

BOHUMIL MACO<sup>a</sup>, ANNA MANDINOVA<sup>b</sup>,  
MARKUS DÜRRENBERGER<sup>b</sup>, BEAT W. SCHÄFER<sup>c</sup>,  
BRANISLAV UHRÍK<sup>a</sup>, and CLAUD W. HEIZMANN<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic, <sup>b</sup>Maurice E. Müller-Institute, Biocentrum, University of Basel, Switzerland, <sup>c</sup>Division of Clinical Chemistry and Biochemistry, Department of Pediatrics, University of Zurich, Switzerland

Calcium ions play an important role in the regulation of large number of cellular processes<sup>1-5</sup>. S100 proteins are the largest subfamily of EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins<sup>6</sup>. S100A1 is mainly expressed in heart muscle cells<sup>7</sup> and localization studies may help clarify its role in Ca<sup>2+</sup>-signalling.

Human heart muscle was fixed in 3 % paraformaldehyde and 0.5 % glutaraldehyde and embedded in Lowicryl K4M. Three different blocks of tissue were used. From each block 3 different grids with sections were prepared. 16 micrographs were taken from each grid and printed at total magnification of 17 500×. Sections were labelled with polyclonal goat anti-serum against human S100A1. Rabbit anti-goat antibody conjugated with 15 nm gold particles was used as secondary antibody. Distribution of gold particles was related to areal densities of structural components of the cells.

The normalized values (Table I) compensate for differences in immuno-labelling between individual blocks and show that the S100A1 density at Z-lines is about 2 and in case of sarcoplasmic reticulum (SR) more than 3 times higher than in other structural components. These differences are significant (p<0.05).

Similar S100A1 localizations in myofibrils in heart and skeletal muscles<sup>8</sup> suggest close relationship of the S100A1 to myofibrillar proteins. Direct interaction of S100A1 with F-actin *in vitro* has already been demonstrated<sup>9</sup>. The S100A1 protein in Z-line is assumed to modulate the actin capping protein, CapZ (Ref.<sup>10</sup>) which controls actin polymerization. The presence of S100A1 in SR vesicles may be related to increased caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release by S100A1 (Ref.<sup>11</sup>), to interaction with adenylate cyclase<sup>12</sup>, to stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from SR vesicles<sup>13</sup> and to interaction with the ryanodine receptor<sup>14</sup>.

This work was supported by the Slovak grant agency for science (grant No. 2/6086/20).

#### REFERENCES

- Breier A., Sulová Z., Vrbanová A.: Gen. Physiol. Biophys. 17, 179 (1998).



2. Sulová Z., Vyskočil F., Stankovičová T., Breier A.: *Gen. Physiol. Biophys.* 17, 271 (1998).
3. Bastianelli E., Moutairou K., Akélé-Akpo M. T., Darboux R., Pochet R.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 5 (1999).
4. Lipská E., Radzyukevich T.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 139 (1999).
5. Kamouchi M., Droogmans G., Nilius B.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 199 (1999).
6. Heizmann C. W., Cox J. A.: *Biometals* 11, 383 (1998).
7. Pedrocchi M., Hauer C. R., Schäfer B. W., Erne P., Heizmann C. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 529 (1993).
8. Maco B., Brezová A., Schäfer B. W., Uhrík B., Heizmann C. W.: *Gen. Physiol. Biophys.* 16, 373 (1997).
9. Mandinova A., Atar D., Schäfer B. W., Spiess M., Aebi U., Heizmann C. W.: *J. Cell Sci.* 111, 2043 (1998).
10. Ivanenkov V. V., Dimlich R. V., Jamieson G. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 46 (1996).
11. Weber C., Remppis A., Heizmann C. W., Katus H. A., Fink R. H. A.: *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18, 192 (1997).
12. Fanň G., Angelella P., Marrigio D., Aisa M. C., Giambanco I., Donato R.: *FEBS Lett.* 248, 9 (1989).
13. Fanň G., Marsili V., Angelella P., Aisa M. C., Giambanco I., Donato R.: *FEBS Lett.* 255, 381 (1989).
14. Treves S., Scutari E., Robert M., Groh S., Ottolia M., Prestipino G., Ronjat M., Zorzato F.: *Biochemistry* 36, 11496 (1997).

## 06 CYTOPLAZMATICKÁ MEMBRÁNA JAKO REGULAČNÍ BARIERA PROTICHŮDNÝCH ENZYMATICKÝCH AKTIVIT – RESTRIKCE A MODIFIKACE DNA

INGE HOLUBOVÁ<sup>a</sup>, KEITH FIRMAN<sup>b</sup>, ŠTĚPÁNKA VEJSADOVÁ<sup>a</sup> a MARIE WEISEROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiologický Ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>Biophysics Laboratories, School of Biological Sciences, University of Portsmouth, St. Michael's Building, White Swan Road, Portsmouth PO1 2DT, United Kingdom

Restrikčně-modifikační systémy (R-M) vybavují hostitelskou bakteriální buňku imunitou vůči infekci cizorodou DNA a současně chrání buněčnou DNA před restrikcí methylací adenosylových nebo cytosylových zbytků v nukleotidové sekvenci rozpoznávané restrikčními enzymy. V případě R-M enzymů typu I jsou obě tyto funkce výsledkem působení jednoho enzymového komplexu složeného ze tří podjednotek HsdR, HsdM a HsdS kódovaných odpovídajícími geny *hsd*. Komplex stechiometrie 2R2M1S restringuje nemetylovanou a modifikuje hemimetylovanou DNA, menší komplex 2M1S, který je mezistupněm při sestavování enzymového komplexu<sup>1</sup>, má pouze methylasovou aktivitu. Modifikace předpokládá lokalizaci enzymu uvnitř buňky; pro restrikci cizorodé DNA se lokalizace na buněčném povrchu jeví strategicky výhodnější. Předložené sdělení je shrnutím výsledků týkajících se lokalizace R-M enzymu *EcoKI* v buňce *Escherichia coli*.

Z kmenů *E. coli* produkujících kompletní endonukleasu, methylasu, resp. jednotlivé polypeptidy Hsd byly připraveny subcelulární frakce<sup>2</sup>. Solubilizované proteiny příslušných frakcí byly rozděleny elektroforeticky v SDS polyakrylamidovém gelu<sup>3</sup> a přeneseny na PVDF membránu. Podjednotky *EcoKI* byly identifikovány pomocí polyklonálních protilátek a k detekci imunokomplexů byla použita metoda chemiluminiscence (ECL Western Blotting System, Amersham).

Analýza frakcí prokázala, že endonukleasa i methylasa jsou asociovány s cytoplazmatickou membránou. Samostatné podjednotky HsdR a HsdM jsou rozpustné cytoplazmatické proteiny a k jejich asociaci s membránou dochází pouze při spojení s podjednotkou HsdS do funkčního enzymu. Uvolnění enzymu z membránové frakce působením benzonasy indikuje účast DNA v této interakci.

Ke studiu topologie vazby *EcoKI* s cytoplazmatickou membránou byla použita proteolýza sféroplastů trypsinem. Působením trypsinu na intaktní sféroplasty kmene produkujícího komplexní endonukleasu dochází pouze k proteolýze podjednotky HsdR. Za stejných podmínek jsou podjednotky HsdM a HsdS plně chráněny před účinkem trypsinu, i když nejsou vůči působení trypsinu strukturálně rezistentní.

Předpokládáme, že podjednotka HsdR R-M enzymu *EcoKI* je exponována na vnějším povrchu cytoplazmatické membrány, zatímco podjednotky HsdM a HsdS (komponenty methylasy) jsou lokalizovány uvnitř sféroplastu. Tato prostorová orientace umožňuje přístup enzymu k oběma substrátům: k rezidentní DNA v cytoplazmě, kterou v průběhu replikace metylyluje a k cizorodé DNA, kterou při vstupu do buňky restringuje. Interakce *EcoKI* s cytoplazmatickou membránou zřejmě hraje klíčovou úlohu v regulaci těchto protichůdných aktivit enzymu *EcoKI*.

Autoři děkují za finanční podporu grantům GA ČR 204/96/1365 a Wellcome Trust 054514/Z/98/Z/IGS/RC/CRD.

## LITERATURA

1. Dryden D. T., Cooper L. P., Thorpe P. H., Byron O.: *Biochemistry* 36, 1065 (1997).
2. Minsky A., Summers R. G., Knowles J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4180 (1986).
3. Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).

## 07 THE CELL INVASIVE BORDETELLA PERTUSSIS ADENYLATE CYCLASE TOXIN: A MODEL OF PROTEIN PENETRATION ACROSS CELL MEMBRANES AND A NEW TOOL FOR THE IMMUNOLOGIST

RADIM OSIČKA<sup>a</sup>, ADRIANA OSIČKOVÁ<sup>a</sup>, TŮMAY BASAR<sup>a</sup>, SILVIA BEZOUŠKOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>c</sup>, PETR HALADA<sup>c</sup>, JIŘINA LOUCKÁ<sup>a</sup>, JANA VODOLÁNOVÁ<sup>a</sup>, MILOŠ KALHOUS<sup>a</sup>, STANISLAV FORMAN<sup>a</sup>, MARCELA ŠIMŠOVÁ<sup>a</sup>, ABDELHAKIM ASHABANI<sup>b</sup>, ZOHRA MOUKRIM<sup>c</sup>, PIERRE GUERMONTPREZ<sup>c</sup>, ELKE MAYER<sup>f</sup>, ROLAND BENZ<sup>f</sup>, BOŽENA CUKROWSKA<sup>b</sup>, LUDMILA TUČKOVÁ<sup>b</sup>,

VALERIA SHESHKO<sup>a</sup>, HELENA TLASKALOVÁ<sup>b</sup>,  
GILLES DADAGLIO<sup>c</sup>, CATHERINE FAYOLLE<sup>c</sup>,  
MURRAY HACKETT<sup>d</sup>, CLAUDE LECLERC<sup>e</sup>,  
and PETER ŠEBO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Cell and Molecular Microbiology Division, <sup>b</sup>Immunology and Gnotobiology Division and <sup>c</sup>Division of Biotechnology and Biogenesis of Natural Compounds, Institute of Microbiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, <sup>d</sup>Department of Medicinal Chemistry, University of Washington, Seattle, USA, <sup>e</sup>Unité de Biologie des Régulations Immunitaires, Institut Pasteur, Paris, France, <sup>f</sup>Lehrstuhl für Biotechnologie, Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum) der Universität Würzburg, Würzburg, Germany

The *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin-hemolysin (ACT or CyaA) is an intriguing example of a large protein capable to translocate directly across the cytoplasmic membrane of target cells, such as macrophages and neutrophils and to deliver into cell cytosol an adenylate cyclase domain (AC). This catalyses uncontrolled conversion of ATP to the key second messenger, cAMP, thereby causing cell intoxication and inducing apoptosis. In order to get insight into the unique membrane translocation process of ACT, we have subjected the gene for this protein to extensive linker insertion and site directed mutagenesis<sup>1,4,5</sup>. Specific mutations dissociating membrane translocation of the AC domain into cells from ACT membrane insertion were obtained and define structures involved in penetration of the AC across membranes<sup>1,4,5</sup>.

In parallel studies, the unique mechanism of posttranslational activation of ACT, consisting in fatty-acyl modification of ACT by the protein acyltransferase CyaC was studied<sup>1</sup>. Both the palmitoylation sites at K860 of ACT, as well as a set of mutated acyltransferase proteins were generated and the *in vivo* acylation status of co-expressed ACT was determined. Residues potentially involved in catalysis of acyl transfer from palmitoyl-ACP to ACT were identified in CyaC (His33, Ser30), as well as residues determining the choice of palmitoylation sites on ACT by the acyltransferase CyaC (Ala140). Our results suggest that palmitoylation of K983 is essential for membrane interaction capacity of ACT, while acylation of K860 of ACT is dispensable.

As further product of the mutagenesis studies, a number of permissive sites was identified through the ACT molecule, at which epitope tags and foreign antigenic determinants could be inserted without altering the cell invasive activity of the toxin<sup>4</sup>. Such tagged ACT molecules are now used as tools for studies on mechanism of membrane interaction and transmembrane topology of ACT. Moreover, these mutant ACT are now becoming a valuable tool for the immunologist for inducing specific cellular immune responses against viruses and tumors.

ACT was recently shown to accommodate, at several sites within the AC domain, heterologous peptides such as viral epitopes, without losing cell-invasiveness<sup>7</sup> and ACT could be exploited *in vivo* for delivery of foreign epitopes into MHC class I antigen presenting cells and induction of protective cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell (CTL) responses<sup>2,3,6-8</sup>. In order to evaluate the carrier potential of ACT and to map ACT domains allowing epitope delivery for MHC class I presentation, vari-

ous CTL epitopes were inserted at different positions through the ACT molecule, either alone or in combination. The immunological properties of such constructs were analyzed in mice. Efficient delivery for MHC class I presentation *in vitro* and induction of epitope-specific CTL *in vivo* was achieved for antigenic fragments of up to 76 amino-acids, resulting in protective CD8<sup>+</sup> T-cell immune responses against a lethal challenge with the LCMV virus and partially protecting mice against transplanted tumors<sup>2,6</sup>.

Recently, a 32-residue-long peptide derived from wheat  $\alpha$ -gliadin and inserted in the AC domain was shown to be a potent immunogen when presented in the context of the ACT molecule and induced significantly higher levels of specific anti-gliadin antibodies in mice than purified  $\alpha$ -gliadin itself. The antigenicity of the ACT-gliadin construct was dependent on the acylation status of the vector ACT molecule.

The sum of the above mentioned results shows that ACT not only is an intriguing model for analysis of molecular mechanisms underlying activation of proteins by fatty acylation and of spontaneous protein translocation across lipid bilayer of cellular membranes. The knowledge acquired in such studies on ACT can also be transformed into useful applications for design of a promising new vector molecule (antigen carrier) for induction of both specific CTL and antibody responses against heterologous antigens. Recent developments in these two major directions of research on ACT structure-function relationships and immunological applications, as well as the current model of ACT action, will be presented in a comprehensive lecture summarizing a series of accompanying poster presentations.

*This work was supported by grants No. 310/98/0432 from the Grant Agency of the Czech Republic, No. A5020907 of the Grant Agency of the Academy of Sciences and grants No. VS96149 and ME167 of the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic to P. S., by NIH grant R01 DK46440-06 to M. H., by grants to R. B. from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds der Chemischen Industrie and by grants from Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS) and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) to C. L.*

## REFERENCES

- Basar T., Havlíček V., Bezoušková S., Halada P., Hackett M., Šebo P.: *J. Biol. Chem.* 274, 10777 (1999).
- Fayolle C., Ladant D., Karimova G., Ullmann A., Leclerc C.: *J. Immunol.* 162, 4157 (1999).
- Fayolle C., Šebo P., Ladant D., Ullmann A., Leclerc C.: *J. Immunol.* 156, 4697 (1996).
- Osička R., Osičková A., Basar T., Guernonprez P., Rojas M., Leclerc C., Šebo P.: *Infect. Immun.* 68, 248 (2000).
- Osičková A., Osička R., Meyer E., Benz R., Šebo P.: *J. Biol. Chem.* 275, 37644 (1999).
- Saron M. F., Fayolle C., Šebo P., Ladant D., Ullmann A., Leclerc C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3314 (1997).
- Šebo P., Fayolle C., d'Andria O., Ladant D., Leclerc C., Ullmann A.: *Infect. Immun.* 63, 3851 (1995).
- Šebo P., Moukrim Z., Kalhous M., Schaft N., Dadaglio G., Sheshko V., Fayolle C., Leclerc C.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26, 167 (1999).

**08 IVA50: AN UNIQUE ANTI-CD9 MONOCLONAL ANTIBODY**JANA TOMÁŠKOVÁ, MICHAL SIMON,  
ROMAN DUŠINSKÝ, and PETRONELA KOVÁČIKOVÁ*Department of Immunogenetics, Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

Monoclonal antibodies (mAbs) are widely used to probe the function of cell-surface molecules. Some mAbs induce cell activation and this is taken to indicate a signalling role of the target antigen. A unique monoclonal antibody IVA50 specific for bovine as well as human surface molecule CD9 has been prepared.

CD9 antigen, a member of the tetraspanin (TM4) superfamily, is a 24–27 kDa surface membrane glycoprotein present on platelets and a variety of different hematopoietic and nonhematopoietic cells<sup>1</sup>. CD9 has been reported to play a role in regulation of cell proliferation, motility and adhesion<sup>2–4</sup>. In accordance with the signaling function, CD9 is reported to associate with small GTP-binding proteins<sup>5</sup> and platelet integrin GPIIb/IIIa (Ref.<sup>6</sup>). It was also found that CD9 itself elicits an intracellular signal(s) without involvement of FcR, although the precise role for CD9 in platelet activation remains to be determined<sup>7</sup>.

Hybridoma cell line producing mAb IVA50 was obtained after immunization of BALB/c mice with bovine platelets. Reactivity of IVA50 with bovine peripheral blood cells was studied by an indirect immunofluorescence test. The positive reactions were recorded with platelets and granulocytes, negative reactions with lymphocytes and erythrocytes. IVA50 cross-reacted also with human platelets and granulocytes. IVA50 specifically immunoprecipitated a protein having a molecular weight of 24–25 kDa under reducing and nonreducing conditions from lysates of biotinylated bovine platelets. Immunoblotting analysis demonstrated the binding of mAb with 24–25 kDa protein when platelet proteins were electrophoresed under nonreducing conditions. The cross-reactivity of IVA50 with human cells was employed to demonstrate that the antigen is a bovine homologue of human CD9 protein. IVA50 was compared with standard mAb MM2/57 to human CD9 on human platelets. Both mAbs immunoprecipitated the molecules from human platelets having the identical molecular mass. Sequential immunoprecipitation data and Western blot analysis of immunoprecipitated MM2/57 antigen with IVA50 also confirmed that both antibodies react with the same molecule.

IVA50 is also a potent activator of platelet function, including aggregation and protein tyrosine phosphorylation. Stimulation of platelets by treatment with IVA50 caused an induction of tyrosine phosphorylation of several platelet proteins. The prominent tyrosine phosphorylated proteins were p80, p64, p62 and p40, while p62 was appeared 5 minutes after stimulation.

Finally the tyrosine phosphorylation of the IVA50 antigen itself was examined. Tyrosine phosphorylation of the BoCD9 was observed in thrombin-stimulated platelets. This type of post-translational modification of CD9 has not been observed so far. In addition to BoCD9 another two phosphorylated proteins (p85 and p120) were immunoprecipitated.

In conclusion, an antibody IVA50 is unique in its specificity to both bovine and human CD9 antigen. It is the first antibody that specifically recognizes phosphorylated bovine CD9. IVA50 may therefore become a valuable tool in the understanding of the signal transduction from the BoCD9 into the cell.

*This work was supported by the VEGA grant No. 155/0214/2000.*

## REFERENCES

1. Wright M. D., Tomlinson M. G.: *Immunol. Today* 15, 588 (1994).
2. Rubinstein E., Le Naour F., Billard M., Prenant M., Boucheix C.: *Eur. J. Immunol.* 24, 3005 (1994).
3. Ikeyama S., Koyama M., Yamaoko M., Sasada R., Miyake M.: *J. Exp. Med.* 177, 1231 (1993).
4. Masellis-Smith A., Shaw A. R. E.: *J. Immunol.* 152, 2768 (1994).
5. Seehafer J. G., Shaw A. R. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 401 (1991).
6. Indig F. E., Diaz-Gonzales F., Ginsberg M. H.: *Biochem. J.* 327, 291 (1997).
7. Qi R., Ozaki Y., Kuroda K., Asazuma N., Yatomi Y., Satoh K., Nomura S., Kume S.: *J. Immunol.* 157, 5638 (1996).

**09 SEARCHING FOR A COMMON TRANSPORT MECHANISM FOR CYCLOSPORINE A AND OTHER PHARMACOLOGICALLY IMPORTANT CYCLIC PEPTIDES AND SILYMARINES IN LIVER CELL PLASMA MEMBRANE**

JIRÍ ŠEBESTIAN

*Laboratory of Biomembranes, University of South Bohemia, Faculty of Biological Sciences, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice*

Cyclosporine A, a cyclic undecapeptide, is widely used as a powerful immunosuppressant in organ transplantations. Like the most of other biologically active compounds it has got their effector sites in the cytoplasm of cells. But for solving of medicinal problems there is primary important transport of these compounds into the cell through their plasma membrane to reach effective concentration of medicine or toxin in the cell. Cyclosporine A and some other pharmacologically important compounds (medicines or toxins) with common cyclopeptide structural feature (i.e. alga toxin microcystine, mushroom toxins amanitin and phalloidin etc.) and flavanolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) were investigated in this study. For these compounds there are known intracellular mechanisms of their toxic effects and probable transport mechanisms into the cytoplasm. These mechanisms are completely different<sup>1–3</sup>. But among some of these compounds binary competitions were described<sup>4–6</sup>. 90 % of these compounds are metabolized in liver<sup>7</sup>.

To test the hypothesis that there is some place of common interaction during their transport into the liver cell – all of these compounds were tested. Binding of tritium marked cyclospo-



rine A to temporary hepatocyte culture and to isolated liver cell plasma membranes was measured. For competition non-radioactive other compounds were added and decreasing in cell associated cyclosporine A was stated. Changes in membrane fluidity raised by cyclic peptides or silymarines were monitored by diphenylhexatriene fluorescence anisotropy.

*This work was supported by grants GA CR 204/98/P129, MSMT VS96085, MSMT CEZ:J06/98:123100001 and MSM 151100003.*

#### REFERENCES

1. Wieland T., Nassal M., Kramer W., Fricker G., Bickel U., Kurz G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5232 (1984).
2. Dressler D., Ziegler K.: Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 737 (1990).
3. Fricker G., Drewe J., Huwyler J., Gutmann H., Beglinger C.: British J. Pharmacol. 118, 1841 (1996).
4. Hermansky S. J., Stohs S. J., Eldeen Z. M., Roche V. F., Mereish K. A.: J. Appl. Toxicol. 11, 65 (1991).
5. Mereish K. A., Bunner D. L., Ragland D. R., Creasia D. A.: Pharmaceut. Res. 8, 273 (1991).
6. Morazzoni P., Bombardelli E.: Fitoterapia 66, 3 (1995).
7. Wagner O., Schreier E., Heitz, F., Maurer, G.: Drug. Metab. Dispos. 15, 377 (1987).

#### 10 INWARD AND OUTWARD TRANSPORT OF STEROLS IN YEAST SHOW DIFFERENT SENSITIVITY TO CELL GROWTH

LUCIA HRONSKÁ, VLASTA KLOBUČNÍKOVÁ,  
and IVAN HAPALA

*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

Ergosterol as a typical fungal sterol is the target of several antimycotic substances. Although its biosynthesis is quite well characterized, only little is known about its transfer between individual intracellular membranes. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, sterols may exist in two forms: as free sterols in membranes and as esterified sterols in lipidic particles. Plasma membrane is the major reservoir of free ergosterol in fungal cells. In principle, there are two independent pathways how ergosterol is delivered to plasma membrane. In normal cells competent in sterol synthesis, newly synthesized ergosterol is transported from endoplasmic reticulum (ER – the site of its synthesis) to plasma membrane (“outward transport”). Cells deficient in ergosterol synthesis rely on the uptake of sterols from the medium. The majority of free sterol accumulated by sterol-depleted yeast cells from the medium remains associated with the plasma membrane. However, a significant portion of external sterols may be internalized (“inward transport”) and converted to steryl esters in the ER. There is a lack of reliable data on the mechanism of the outward transfer of ergosterol from ER to plasma membrane<sup>1</sup>. On the other hand, sterol uptake from the medium is known to be driven by sterol depletion and it was reported to be inhibited in the presence of heme in yeast cells<sup>2,3</sup>.

In our studies of mechanisms of sterol movement in both inward and outward directions in the yeast *S. cerevisiae* we have used *hem1* mutant deficient in  $\delta$ -aminolevulinic acid (dALA) synthase. Due to its heme deficiency, this mutant is not able to synthesize ergosterol but it takes up external sterols from the medium. The differential inhibition of ergosterol synthesis in the presence of normal heme synthesis was achieved by treatment with terbinafine (inhibitor of squalene epoxidase) of *hem1* cells supplied with dALA. Delivery of newly synthesized ergosterol to plasma membrane was monitored by changes in the sensitivity of yeast to nystatin. This polyene macrolide exerts its antimycotic activity by formation of hydrophilic pores specifically in ergosterol-containing membranes<sup>4</sup>. Increased permeabilization of yeast cells to propidium iodide or lysis of spheroplasts in the presence of nystatin can be thus used as an indicator of ergosterol presence in plasma membranes. Uptake of external sterols was studied by two independent methods: by nystatin permeabilization and by direct measurement of <sup>14</sup>C-cholesterol accumulation in yeast cells. In the latter case, formation of cholesteryl esters was used as a marker for arrival of cholesterol in intracellular membranes (ER). To estimate possible interference of sterol trafficking with cell growth, both sterol internalization and transfer from ER to plasma membrane were studied in growing cells (incubation in YPD medium) and in non-growing cells (incubated in buffer).

When incorporation of external sterols into the plasma membrane of *hem1* cells was monitored by induction of nystatin sensitivity, it was driven solely by sterol depletion independent on heme synthesis or growth. Similarly, the uptake of the external <sup>14</sup>C-cholesterol probe by ergosterol-depleted cells was dependent primarily on sterol depletion. Surprisingly, internalization of external sterols (estimated as cholesterol esterification in the ER) was significant also in non-growing cells with induced heme synthesis. On the contrary, transport of newly synthesized ergosterol from ER to plasma membrane showed different kinetics in growing and non-growing ergosterol-depleted cells. Cells incubated over a 5 hour period in buffer with glucose as energy source and dALA to stimulate ergosterol synthesis did not show any increase in nystatin sensitivity although efficient ergosterol synthesis was detected by isotope labelling in these cells. Cells cultivated under similar conditions in growth media have acquired sensitivity to nystatin in less than one hour. This differential response of sterol uptake and plasma membrane delivery to cell growth indicates that outward and inward movement of sterol molecules may use different routes in the yeast *S. cerevisiae*.

*This work was supported by VEGA grant No. 2/5046/98.*

#### REFERENCES

1. Daum G., Lees N. D., Bard M., Dickson R.: Biochim. Biophys. Acta 878, 93 (1998).
2. Lorenz R.T., Rodriguez R. J., Lewis T. A., Parks L. W.: J. Bacteriol. 167, 981 (1986).
3. Lewis T. A., Taylor F. R., Parks L. W.: J. Bacteriol. 163, 199 (1985).
4. Bolard J.: Biochim. Biophys. Acta 864, 257 (1986).



## 11 STRUCTURAL ALTERATIONS OF THE RAT OVARIAN LH/hCG RECEPTOR INDUCED BY PROTEIN-MODIFYING REAGENTS

SOŇA SCSUKOVÁ, MIROSLAVA JEŽOVÁ,  
and JAROSLAV KOLENA

*Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, 833 06 Bratislava, Slovak Republic*

Chemical modification of the receptor amino acid residues with protein-modifying reagents can help to establish the specific amino acids essential for ligand binding. Previously it has been implicated that histidine residues of the rat ovarian LH/hCG receptor are necessary for the hormone binding<sup>1</sup>. In the present work, treatment of the membrane-bound LH/hCG receptor with a histidine specific reagent diethylpyrocarbonate (DEPC) resulted in a concentration-dependent decrease in hCG specific binding activity. Modification of histidyl residues was connected with an alteration of the physical state of ovarian membranes. Membrane lipid rigidity, as determined by fluorescence polarization of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), decreased in DEPC-treated membranes. Possible structure-functional relationships of the LH/hCG receptor were analyzed by intrinsic fluorescence and thermal perturbation techniques due to the action of DEPC (Ref.<sup>2</sup>). Fluorescence quenching experiments indicated that DEPC did not change the accessibility of fluorophores to acrylamide. The Stern-Volmer constants ( $K_{SV}$ ) determined from the Stern-Volmer plots for control and 0.1 and 1 mM DEPC-treated membranes were found to be 4.7 M<sup>-1</sup> vs. 5.7 and 5.2 M<sup>-1</sup>, respectively. Heat inactivation of hCG-binding sites demonstrated that there was a significant destabilization of the LH/hCG receptor structure when membranes were treated with DEPC. Thermal destabilization produced by 5 mM-DEPC caused a decrease in  $T_{50}$  value by 12 °C. Although DEPC shows a good specificity for histidine, it can also react with other amino acids, such as lysine, cysteine, tryptophan and tyrosine, and hydroxylamine only partially restored the binding activity of hCG to the membrane ovarian receptor after inhibition with DEPC. We therefore studied the inhibitory effect of protein-modifying reagents with specificity toward these amino acid residues.

Incubation of ovarian membranes with tryptophan-specific reagents *N*-bromosuccinimide (NBS) and 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide (HNB-Br) reduced the ability of the LH/hCG receptor to bind hCG and increased the membrane lipid rigidity. Oxidation of tryptophan residues by NBS decreased the accessibility of fluorophores for acrylamide, the  $K_{SV}$  constants for control and NBS-treated membranes were found to be 7.0 M<sup>-1</sup> and 4.4 M<sup>-1</sup>, respectively. During the incubation of ovarian membranes treated with 1 mM-NBS or HNB-Br at a constant temperature of 50 °C, the damage of hCG binding sites was apparently manifested after 5 min. Treatment of ovarian membranes with tyrosine-specific reagents 2,4-dinitrofluorobenzene (2,4-DNFB) and acetic anhydride (AcA) resulted in a dose-dependent reduction of hCG binding activity and an alteration of membrane lipid rigidity. The Stern-Volmer constants for control and 2,4-DNFB or AcA treated membranes were found to be 4.2 and 4.6 M<sup>-1</sup> vs. 2.4 and 3.3 M<sup>-1</sup>,

indicating that the accessibility of fluorophores for acrylamide was reduced. Thermal destabilization of the receptor structure produced by 10 and 20 mM 2,4-DNFB caused a decrease in  $T_{50}$  value by about 3 and 8 °C, respectively.

Modification of the LH/hCG receptor by the studied protein-modifying reagents suggests that histidyl, tyrosyl and tryptophan residues are located at or close to the hCG binding sites, as well as that perturbations of the membrane at a site distant from the binding sites elicit an alteration of structure-functional properties of the receptor.

*This work was supported by Grant VEGA 2/7179/20.*

## REFERENCES

1. Kolena J., Šeboková E.: *Exp. Clin. Endocrinol.* 89, 237 (1987).
2. Kolena J., Scsuková S., Ježová M., Furdová J., Tatara M., Jasem P.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 113, 53 (1995).

## 12 EFFECT OF ALBUMIN ON STRUCTURAL ALTERATION OF RAT OVARIAN LH/hCG RECEPTORS

JAROSLAV KOLENA, MIROSLAVA JEŽOVÁ,  
and SOŇA SCSUKOVÁ

*Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, 833 06 Bratislava, Slovak Republic*

The stability of macromolecules in their native conformation has become a topic of increasing attention over the last several years. The stabilizing effect of albumin on structure-functional alteration of LH/hCG receptors was analyzed by thermal perturbation technique. Previously, we showed that the model of thermal inactivation of hCG-binding sites on the ovarian membrane receptor yielded information similar to that obtained by differential scanning calorimetry<sup>1</sup>. On exposing the membranes to BSA the heat inactivation profile of hCG-binding sites was shifted to a temperature higher by about 5 °C ( $T_{50}$  values). The stabilizing effect of BSA was not dependent on its presence in the course of thermal inactivation. The effect was similar when membranes were just preincubated at 24 or 4 °C for 30 min. Thermal inactivation of the LH/hCG receptor is a quick process. Incubation of untreated membranes at a constant temperature of 48 °C resulted after 5 min in an about 25 % loss of binding sites, while membranes containing oleic acid exhibited an almost 90 % decrease. The receptor destabilizing action of arachidonic and oleic acids incorporated into ovarian membranes and reversal of this effect when BSA was used as fatty acid scavenger, may indicate that free fatty acids are responsible for the thermal instability of hCG-binding sites. This presumption was corroborated by digestion of membranes with phospholipase-A<sub>2</sub>. The digestion of ovarian membranes with PLA<sub>2</sub> diminished in a dose dependent manner the stability of the LH/hCG receptor. BSA could reverse thermal destabilization of hCG-binding

sites. Insertion of arachidonic acid into ovarian membranes decreased membrane lipid rigidity and BSA reversed this effect. However, alterations of the ordering of the lipid environment in which the receptor is embedded was not found to be a necessary prerequisite for stabilization of the LH/hCG receptor structure. Quenching of the intrinsic fluorescence of protein by extrinsic agents provide information on the accessibility and microenvironment of protein fluorophores and on the dynamics of the protein matrix surrounding these residues<sup>2</sup>. Fluorescence quenching studies indicated that fatty acids elevated the accessibility of fluorophores for acrylamide. The Stern-Volmer quenching constant for control and oleic acid treated membranes was found to be  $2.8 \text{ M}^{-1}$  and  $6.9 \text{ M}^{-1}$ , respectively. Extraction of oleic acid with BSA was comparable to the quenching of BSA-treated membranes. Preincubation of membranes with  $\text{PLA}_2$  resulted in a similar dose-dependent increase in the accessibility of ovarian fluorophores and in a comparable BSA inverting effect. BSA was found to enhance gonadotropin-stimulated cAMP formation in rat luteal cells as well as porcine ovarian granulosa cells. Treatment of ovarian membranes with BSA decreased a dissociation constant ( $K_d$ ) and increased a limiting fluorescence ( $F_{\text{max}}$ ) of anionic probe 8-anilino-1-naphthalene sulphonate compared to untreated membranes. On the contrary, the cationic probe monodansylcadaverine showed a decrease of  $F_{\text{max}}$  and number of binding sites with an increased  $K_d$  upon incubation of membranes with BSA. The results indicate that the stabilizing effect of BSA on the LH/hCG receptor structure may be associated with reduction of a negative membrane surface charge.

*This work was supported by grant VEGA 2/7179/20.*

#### REFERENCES

1. Kolena J., Scsuková S., Tatara M., Jasek P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 293 (1994).
2. Efting M. R., Ghiron C. A.: *Biochemistry* 15, 672 (1976).

### 13 KRÁLIČÍ PROTILÁTKY PROTI EXTRACELULÁRNÍM SEKVENCÍM OXYTOCINOVÉHO RECEPTORU

BLANKA ŽELEZNÁ<sup>a</sup>, JIŘINA SLANINOVÁ<sup>b</sup>,  
LEOPOLD VESELSKÝ<sup>a</sup>, JAN JEŽEK<sup>b</sup> a JIŘÍ VELEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav molekulární genetiky a <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 37 Praha 6

Oxytocinový receptor patří do rodiny receptorů vázajících G-protein. Příprava protilátky proti receptoru spřaženému s G-proteinem je komplikována tím, že receptor se sedmi transmembránovými úseky lze obtížně solubilizovat aniž by se narušila jeho sekundární struktura a navíc je v buněčných membránách přítomen v malé koncentraci. Pro přípravu protilátek proti oxytocinovému receptoru, jehož primární struktura byla stanovena pro několik živočišných druhů<sup>1,2</sup>, jsme proto zvolili jako antigen konjugáty synteticky připravených krát-

kých úseků receptoru. Takový postup je výhodný tím, že syntetický peptid můžeme vyrobit v dostatečném množství a pokud vybereme mimomembránové sekvence, vyhneme se problému s rozpustností antigenu.

K imunizaci jsme vybrali dva peptidy: EVADGVF (99-106) z druhé a WDITFRFY (179-185) z třetí extracelulární oblasti receptoru. Oba peptidy byly připraveny ve dvou formách: jako lineární hepta- a oktapeptid a jako násobné antigenní peptidy (MAP)<sup>3</sup> konstruované jako čtyřnásobné cyklické peptidy připojené k tzv. stromečku tvořenému lysinem a kyselinou glutamovou. Peptidy byly syntetizovány na pevné fázi podle Merrifielda<sup>4</sup> *tert*-butyloxykarbonyl/benzylouvu strategií. Z nosiče byly peptidy odštěpeny kapalným fluorovodíkem a rozpuštěny ve zředěné kyselině octové. Pak byly přečištěny preparativní RP HPLC a charakterizovány aminokyselinovou analýzou, hmotnostní spektrofotometrií (FAB MS) a analytickou RP HPLC.

Čtyřem králíkům byla mnohonásobnými podkožními vpichy aplikována suspenze kompletního Freundova adjuvans s 1 mg MAP nebo 1 mg lineárního peptidu konjugovaného s BSA. Po šesti a dvanácti týdnech byly zvířatům injikovány poloviční dávky antigenů. Před imunizací a dva týdny po každé imunizaci byly odebrány vzorky krve a získáno krevní sérum.

V antisérech připravených proti oběma MAP jsme zjistili velmi nízký titer protilátek jak proti MAP, tak proti příslušnému lineárnímu peptidu. Naproti tomu konjugáty lineárních peptidů s BSA vytvořily antiséra s titrem 1:800 (EVADGVF) a 1:3200 (WDITFRFY) jak k lineárním, tak cyklickým peptidům. Zda obě protilátky rozeznávají molekulu oxytocinového receptoru, jsme testovali na membránách buněk HEK OTR, které stabilně exprimují lidský oxytocinový receptor. Na Western blotech lyzovaných membránových bílkovin obě protilátky shodně rozeznávaly dominantní bílkovinu 55 kDa a minoritní bílkovinu zhruba o dvojnásobné molekulové hmotnosti. Bílkoviny podobných molekulových hmotností jsme získali imunoprecipitací lyzovaných membrán HEK OTR buněk našimi protilátkami.

Protilátky proti dvěma krátkým extracelulárním úsekům oxytocinového receptoru rozeznávaly shodně bílkoviny. Molekulová hmotnost menší z nich odpovídá glykosylovanému receptoru, větší může být dimerem dominantní bílkoviny. Protože úseky oxytocinového receptoru, které jsme použili k přípravě protilátek jsou stejné u ovce, prasete, potkana i člověka<sup>5</sup>, získali jsme protilátky proti oxytocinovému receptoru všech těchto živočišných druhů.

*Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 204/99/1435.*

#### LITERATURA

1. Kimura T., Tanizawa O., Mori K., Brownstein M. J., Okayama H.: *Nature* 356, 526 (1992).
2. Rozen F., Russo C., Banville D., Zingg H. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 200 (1995).
3. Tamm J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5409 (1988).
4. Merrifield B., v: *Methods in Enzymology* (Fields G. B., ed.), str. 3. Academic Press New York 1997.
5. Riley P. R., Flint A. P., Abavasekara D. D., Steward H. J.: *J. Mol. Endocrinol.* 15, 195 (1995).

## 14 IDENTIFIKÁCIA IP<sub>3</sub>R1 V SRDCI POTKANU A JEHO MODULÁCIA VPLYVOM IMOBILIZAČNÉHO STRESU

OLGA KRÍŽANOVÁ<sup>a</sup>, LUBOMÍRA ŽÁČIKOVÁ<sup>a</sup>  
a RICHARD KVETŇANSKÝ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 3, 833 34 Bratislava, Slovenská republika, <sup>b</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Vlárská 5, 833 06 Bratislava, Slovenská republika

V srdcovom svale bola dosiaľ dokázaná prítomnosť iba jedného z troch známych typov receptorov pre inozitoltrifosfát, a to IP<sub>3</sub>R1. Jeho fyziologický význam v srdcovom tkanive nie je známy, hoci je už dokázané, že neparticipuje na excitácii a kontrakcii.

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť génovú expresiu IP<sub>3</sub> receptorov typu 1 (IP<sub>3</sub>R1) a 2 (IP<sub>3</sub>R2) v jednotlivých častiach srdca potkanov a možnosť jej modulácie imobilizačným stresom. Najväčšie množstvo mRNA pre IP<sub>3</sub>R1 sme našli v ľavej predsieni. Na stanovenie jeho hladín mRNA v komorách, sme použili metódu „semimested“ RT-PCR, ktorou sa dá amplifikovaný signál výrazne zosilniť oproti tradičnej RT-PCR. Týmto spôsobom sme identifikovali malé množstvá mRNA IP<sub>3</sub>R1 receptora aj v pravej a ľavej komore. Podobnú distribúciu ako pre IP<sub>3</sub>R1 sme zistili aj pre IP<sub>3</sub>R2. Mieru expzie sme vyhodnotili pomocou „housekeeper“ génu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH), ktorej expresia v bunkách je konštantná.

V našej práci nás zaujímal možný vplyv faktoru stresu na génovú expresiu oboch typov receptorov. Vplyvom imobilizačného stresu sme zistili významný nárast hladín mRNA pre IP<sub>3</sub>R1 a IP<sub>3</sub>R2 v srdcových predsieniach. Je veľmi zaujímavé, že tento nárast nastal už po jednorazovej imobilizácii po dobu 2 hodín, s následným trojhodinovým oddychom. Keď boli rovnakému imobilizačnému stresu vystavené adrenalektómované zvieratá (zastavená produkcia glukokortikoidov odstránením nadobličiek), nezistili sme žiadne zvýšenie hladín mRNA pre IP<sub>3</sub> receptory. Svedčí to o priamej, alebo nepriamej stimulácii génovej expzie glukokortikoidmi, v podmienkach imobilizačného stresu. Adrenalektómované zvieratá, ktoré neboli vystavené imobilizačnému stresu, nemali ovplyvnené základné hladiny mRNA pre IP<sub>3</sub> receptory v srdcovom tkanive. Z toho vyplýva, že za normálnych podmienok nie je táto expresia modulovaná glukokortikoidmi.

Táto práca bola financovaná grantami VEGA 2/7158 a 2/6109.

## 15 INTERNALISATION OF TRIMERIC G PROTEINS AND DESENSITISATION OF HORMONE RESPONSE

PETR SVOBODA, ZUZANA PEŠANOVÁ,  
JAN ČERNÝ, and JIŘÍ NOVOTNÝ

Department of Biochemistry of Membrane Receptors, Institute of Physiology, Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Sustained hormone stimulation of target cells results in desensitisation (refractility, tolerance, tachyphylaxis) of hor-

mone response which is associated with internalisation and down-regulation (decrease in total cellular amount) of G protein-coupled receptors (GPCR)<sup>1-3</sup>. Desensitisation of hormone response is also associated with solubilization and subcellular redistribution of trimeric guanine nucleotide binding proteins (G proteins)<sup>4-8</sup>. The cellular and molecular mechanisms of the desensitization mechanisms proceeding at the G protein level are mostly unknown and were subject of our present as well as previous studies.

Clone e2m11 of HEK293 cells expressing high levels of both TRH-receptors (TRH-R) and exogenous G11 $\alpha$  exhibit dramatic agonist (thyrotropin-releasing hormone, TRH)-induced internalisation, solubilization as well as down-regulation G11 $\alpha$  protein. These cells also exhibit an agonist-induced internalisation of the TRH-receptor<sup>9-12</sup>. The agonist-induced internalisation of TRH-R and G11 $\alpha$  protein proceed on different time scales. The internalisation of TRH receptors is rapid process proceeding within minutes, while the first internalisation of G11 $\alpha$  protein is not detectable before 60 min of incubation with the hormone and is clearly demonstrated between 2 and 4 hours of TRH exposure. TRH-R internalisation proceeds via clathrin-dependent pathway, while the mechanism of G protein internalisation is unknown.

The results presented in the present study indicate that internalisation of G11 $\alpha$  protein may be closely related to or be mediated by “membrane-domains” or caveolae, the specific structural compartments of plasma membrane, which are enriched in specific marker protein caveolin and other signalling molecules such as GPI-bound, peripheral membrane proteins, tyrosine-kinases and alkaline phosphatase. The detergent-insensitive membrane domains (DIMs) were isolated by extraction of e2m11-cell homogenate with 1 % Triton X-100 and flotation on sucrose density gradients. The sucrose density fractions were characterised by markers representing the peripheral, GPI-bound as well as integral membrane proteins (caveolin, CD29, CD55, CD59, CD147, the  $\alpha$  subunit of Na, K-ATPase, alkaline phosphatase, adenylyl cyclase). Caveolin-containing DIMs represented only a minor fraction of the overall pool of G $\alpha$ /G11 $\alpha$ -rich domains. Prolonged stimulation of e2m11-cells with TRH resulted in dramatic depletion of G $\alpha$ /G11 $\alpha$  from all DIMs, which was paralleled by a concomitant G $\alpha$ /G11 $\alpha$  increase in the high-density gradient fractions containing the bulk-phase membrane constituents soluble in 1 % Triton X-100. Distribution of membrane markers was unchanged under these conditions. Membrane domains thus represent a substantial structural determinant of the G protein pool relevant to desensitization of hormone action.

This research was supported by CRI grant of The Wellcome Trust for PS.

## REFERENCES

1. Waldo G. L., Northup J. K., Perkins J. P., Harden T. K.: J. Biol. Chem. 258, 13900 (1983).
2. Yu S. S., Lefkowitz R. J., Hausdorff W. P.: J. Biol. Chem. 268, 337 (1993).
3. Zastrow V. M., Kobilka B. K.: J. Biol. Chem. 267, 3530 (1992).
4. Ransnas L. A., Svoboda P., Jasper J. R., Insel P. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86, 7900 (1989).



5. Svoboda P., Kvapil P., Insel P. A., Ransnas L. A.: Eur. J. Biochem. 208, 693 (1992).
6. Kvapil P., Novotný J., Svoboda P., Ransnas L.: Eur. J. Biochem. 226, 193 (1994).
7. Novotný J., Kvapil P., Bokosh G. M., Ransnas L. A.: Arch. Physiol. Biochem. 103, 202 (1995).
8. Svoboda P., Milligan G.: Eur. J. Biochem. 224, 455 (1994).
9. Svoboda P., Kim G.-D., Crassie M. A., Eidne K. A., Milligan G.: Mol. Pharmacol. 49, 646 (1996).
10. Drmota T., Novotný J., Kim G.-D., Eidne K. A., Milligan G., Svoboda P.: J. Biol. Chem. 273, 21699 (1998).
11. Novotný J., Krůšek J., Svoboda P.: Life Sci. 65, 889 (1999).
12. Drmota T., Novotný J., Svoboda P., Milligan G.: Biochem. J. 340, 529 (1999).

## 16 SIGNALING DOWNSTREAM OF TRANSCRIPTION FACTORS – TRANSCRIPTION COACTIVATORS AND COREPRESSORS

PETR FOLK, MONIKA AMBROZKOVÁ,  
MICHAL SKRUŽNÝ, LUDMILA HAMPLOVÁ,  
and FRANTIŠEK PŮTA

*Department of Physiology and Developmental Biology, Faculty of Sciences, Charles University, Viničná 7, 128 00 Prague 2, Czech Republic*

Sequence specific transcription factors (TFs) are the targets of multiple signal transduction pathways, which propagate the signal by modulating TFs functional properties. The effects may include phosphorylation, acetylation, chaperone assisted folding, or selective proteolysis. Some of the modifications affect the affinity or specificity of DNA-element-DNA-binding domain interaction. Frequently, the signals influence the activation function of the transcription factor, changing the way the factor interacts with its downstream targets.

Our understanding of these downstream events changed considerably with the seminal discoveries of chromatin remodeling complexes and histone acetyltransferases and deacetylases<sup>1</sup>. The repertoire of proteins mediating the effects of TFs is unexpectedly complex. It includes coregulator complexes, such as SRC1-1/p160 or SMRT/NCoR complexes, and chromatin remodeling complexes such as SWI/SNF or DRIP. The activation of TF leads to change in recruitment of the coregulator complexes, which influences local chromatin structure by acetylating or deacetylating histones and other regulatory proteins. Subsequently, the chromatin remodeling complexes change the mobility and positioning of nucleosomes, allowing the binding of other TFs and of the components of the general transcription machinery<sup>2</sup>. In addition, signaling pathways were found to influence the coregulators themselves, bypassing the TFs.

Coactivator and corepressor complexes contain enzymatic activities (such as histone acetyltransferases) as well as components mediating protein-protein interactions. Our interest in signal transduction proteins in *Dictyostelium* (<http://www.nih.gov/science/models/index.html>) led us to the discovery of a novel type of coregulator – the SNW protein<sup>3</sup>.

The protein(s) containing the signature >SNWKN< Prp45p/FUN20, spSNW1, SnwA, Bx42, and SKIP/NCoA-62, were recently identified in every eukaryotic organism examined, which indicates ancient and important regulatory function. We and others found the SNW proteins in proximity with diverse signaling partners<sup>4,7</sup>.

In *D. melanogaster*, SNW (Bx42) binds to specific puffs on polytene chromosomes in response to ecdysone<sup>4</sup>. Human SNW (NCoA-62) binds to VDR/RXR heterocomplex and augments steroid receptors activated transcription<sup>5</sup>. Independently, human SNW was found in interaction with Ski (Ref.<sup>6</sup>), a DNA binding oncoprotein. The transcription factor CBF1, which represses transcription through the interaction with the SMRT corepressor complex, also binds to SNW. Another module proven so far to interact with SNW is the ankyrin repeat region of the membrane receptor Notch (Notch IC)<sup>7</sup>. In *Dictyostelium*, we present evidence for the interactions of SnwA with spliceosomal components, which suggests the role of this coregulator in linking transcription regulation and RNA splicing. We also show the ability of yeast SNW protein FUN20/PRP45 to transactivate reporter genes when targeted to DNA regulatory elements.

The multiplicity of interactions suggests that SNW proteins can converge a variety of signals on the preinitiation complex of RNAPolIII and probably also during the elongation phase.

*The financial support of GA ČR 204/98/0406 is gratefully acknowledged.*

## REFERENCES

1. Armstrong J. A., Emerson B. M.: Curr. Opin. Genet. Dev. 8, 165 (1998).
2. Hampsey M., Reinberg D.: Curr. Opin. Genet. Dev. 9, 132 (1999).
3. Folk P., et al.: Gene 181, 229 (1996).
4. Wieland C., et al.: Chromosoma 10, 517 (1992).
5. Baudino T. A., et al.: J. Biol. Chem. 273, 16434 (1998).
6. Dahl R., et al.: Oncogene 16, 1579 (1998).
7. Zhou S., et al.: Mol. Cell Biol. 20, 2400 (2000).

## 17 PHOSPHORYLATION OF SERINE 795 AND THREONINE 373 IS CRITICAL FOR INACTIVATION OF pRb IN TGFβ1 – INDUCED GROWTH ARREST

DANIEL TVRDÍK<sup>a,b</sup>, RASHED DJABORKHEL<sup>a,b</sup>,  
IVAN RAŠKA<sup>a,b</sup>, and JULIUS MÜLLER<sup>a,b</sup>

*<sup>a</sup>Laboratory of Gene Expression, <sup>3rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, <sup>b</sup>Department of Cell Biology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Albertov 4, Prague 2, Czech Republic*

Extracellular signals including cytokines have a profound effect on cell cycle machinery, which is otherwise tightly controlled by several regulatory circuits. Transforming growth



factor beta1 (TGFbeta1) inserts its inhibitory action via different mechanisms depending on the cell type<sup>1</sup>. In this study we found that TGFbeta1 significantly inhibited cell cycle progression of malignant follicular lymphoma-derived DoHH2 cell line. The treatment of TGFbeta1 reduced the number of cells which entered S phase compared to untreated control cells. The sensitivity to TGFbeta1 mediated growth inhibition was confirmed by flow cytometry<sup>2</sup>.

Several nuclear proteins are involved in cell cycle machinery, including the pocket proteins, retinoblastoma tumor suppressor protein pRb, p107 and Rb2/p130, which play a central role in G1/S transition<sup>3</sup>. We studied the phosphorylation status of pRb and the capacity of relevant protein kinases in malignant lymphoma cells. We found that TGFbeta1-induced growth arrest was associated with hypophosphorylation of retinoblastoma protein on serin 795 (S795) and threonine 373 (T373). Although TGFbeta1 treatment did not modulate the level of early/mid G1 cyclins, cyclin D2 and cyclin E or the level of cyclin-dependent kinases (cdk), cdk 4, cdk6 and cdk2, the treatment significantly inhibited phosphorylation activity of both of cyclin D2- and cyclin E-associated kinases, cdk6 and cdk2, respectively<sup>4</sup>.

*This work was supported by Programme Project No. 96129 of Czech Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, Grant No. 304/96/K002 of Grant Agency of the Czech Republic, Wellcome Grant No. 0499 49/Z/97 and by Grant No. 2066-5 of the Ministry of Health of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Sporn M. B., Roberts A. B.: *Cell Regulation 1*, 875 (1990).
2. Tvrđík D., Djaborkhel R., Raška I., Müller J.: *Exp. Cell Res.*, submitted.
3. Grana X., Reddy E. P.: *Oncogene 11*, 211 (1995).
4. Djaborkhel R., Tvrđík D., Raška I., Müller J.: *Exp. Cell Res.*, submitted.

## 18 INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND THEIR BINDING PROTEINS IN SHEEP AMNIOTIC FLUID

JÁN BLAHOVEC<sup>a</sup>, ZUZANA KOSTECKÁ<sup>a</sup>, ANNA SOBEKOVÁ<sup>a</sup>, JÁN MEŠTER<sup>b</sup>, MARIE LACROIX<sup>c</sup>, STEFAN CARPENTIER<sup>d</sup>, and FRANCOISE CAVAILLE<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, University of Veterinary Medicine, Komenského 73, 041 81, Košice, Slovak Republic, <sup>b</sup>INSERM, 184, rue du Faubourg de Saint-Antoine, 755 71 Paris, Cedex 12, France, <sup>c</sup>UREPP, INRA, 78352 Jouy-en Josas Cedex, France, <sup>d</sup>LBP, Inst. Jacques Monod, CNRS – Univ. Paris 7, France

Prenatal growth and foetus development is controlled besides others factors, by the insulin growth factors (IGF) – I and II (Ref.<sup>1</sup>). Moreover it has been recently shown that some peptidic growth factors and their binding proteins may act on development of gastrointestinal and pulmonary tract of human

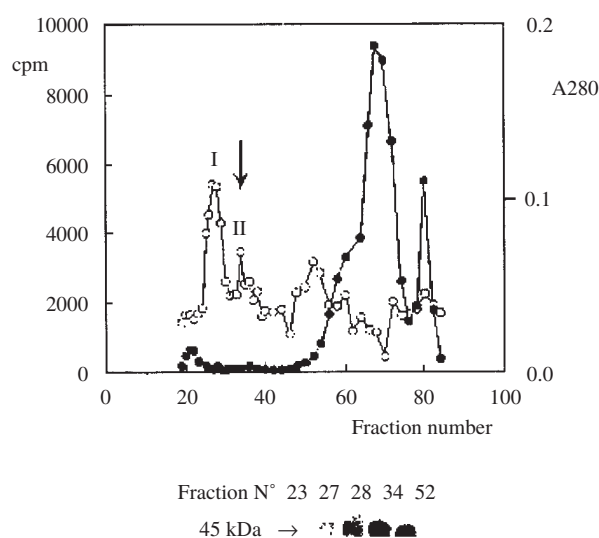


Fig. 1. Gel chromatography of mitogenically active fraction of amniotic fluid on Sephadex G-50. A<sub>280</sub> – black points, cpm (mitogenic activity) – white points. Arrow – elution position of <sup>125</sup>I-IGF 1. Below is ligand – blot of some fractions

foetus<sup>1,2</sup>. The aim of this work is to investigate the presence of IGFs and their binding proteins in sheep amniotic fluid.

Amniotic fluid was obtained in 10<sup>th</sup> week of pregnancy by puncture of the amniotic sac and after delipidation it was stored in lyophilized form. Fractionation of amniotic fluid was performed by gel filtration on column of Sephadex G-10 in 0.04 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. The mitogenically active fraction from this procedure was further chromatographed on column of Sephadex G-50 in 10 % acetic acid. All fractions after measurement of absorbance at 280 nm were tested for mitogenic activity. To determine character of mitogenically active fractions, they were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis followed by ligand blot.

As indicator cells were used mouse fibroblast BP-A31 which become quiescent when deprived of exogenous growth factors.

For the study of mitogenic activity, samples of amniotic fluid were collected at the 10<sup>th</sup> week of gestation, i.e. time of maximum growth of foetal membrane. Non separated amniotic fluid of examined sheep has no mitogenic activity on tested cells. However after elimination of small molecules fraction by gel filtration on Sephadex G-10, the void volume fraction has significant effect on proliferation of BP-A31 cells

Table I  
Mitogenic activity of amniotic fluid after Sephadex G-10; control was taken as 100 % ± σ, n = 5; <sup>a</sup> p<0.05, <sup>b</sup> p<0.001

Tested material on BP-A31 cell	% of mitogenic activity
Control (without mitogen)	100±30
Whole sample	95±20
Void volume fraction	230±10 <sup>b</sup>
Small molecules fraction (M <sub>r</sub> ≤ 700)	50±15 <sup>a</sup>

(Table I). Further separation on Sephadex G-50 revealed that the biological activity was separated into two peaks. One was coeluted with  $^{125}\text{I}$ -IGF 1, other one was eluted immediately after void volume (Fig. 1). The electrophoretic analysis of the fractions with mitogenic activity followed by ligand blot have shown that significant amounts of IGFBPs with  $M_r$  40–45 kDa were present in the first peak, bottom of Figure 1. However immunoblottings of these fractions with antibodies against human IGFBP-1 and IGFBP-3 were unsuccessful.

This work was supported by grant 1/5150-98.

## REFERENCES

- Han V. K. M., Hill D. J., in: *The Insulin-like Growth Factors. Structure and Biological Functions* (Schofield P. N., ed.), p. 178. Oxford University Press, Oxford 1992.
- Kelly V. K., Newell S. J., Brownlee K. G., Farmery S. M., Cullinane C., Reid W. A., Jackson P., Gray S. F., Primrose J. N., Lagopoulos M.: *Arch. Dis. Child. (Fetal and neonatal edition)* 76, F158 (1997).

## 19 NUKLEOLÁRNÍ FAKTOR UBF ASOCIOVANÝ S RIBOZOMÁLNÍ DNA JE SYNTETIZOVÁN A AKTIVOVÁN V S FÁZI BUNĚČNÉHO CYKLU

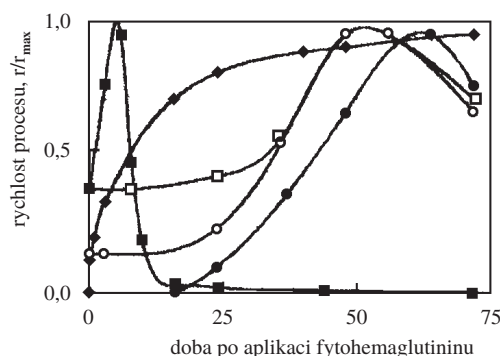
IVAN KALOUSEK a PAVLA KRÍŽKOVÁ

Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1, 128 20 Praha

Syntéza prekurzoru ribozomální RNA probíhá v buněčném nukleolu působením RNA polymerasy I a je regulována minimálně dvěma faktory: multiproteinovým komplexem promotorové selektivity SL1 a enhancerem UBF (upstream binding factor). Syntéza a aktivační fosforylace faktoru UBF reprezentují pozitivní regulační mechanismy, které spolurozhodují o schopnosti buňky vytvářet a zmnožovat vlastní proteosyntetický aparát a následně růst a proliferovat.

Mitogenní transformace normálních lymfocytů stimulovaná jejich interakcí s fytohemaglutininem iniciuje vstup T lymfocytů do buněčného cyklu a mění tak klidové buňky v buňky proliferující podobné lymfoblastům.

Naše výsledky studia syntézy prekurzoru ribozomální RNA metodou Run On assay ukazují, že rychlost syntézy rRNA roste prudce v presyntetické G1 fázi prvního buněčného cyklu. Na počátku syntetické S fáze, monitorované inkorporací antigení determinanty 5-bromo-2'-deoxyuridinu do replikované chromozomální DNA, dosahuje stabilního maxima. Měření rychlosti transkripce genu kódujícího UBF metodou RT-PCR následovanou hybridizací značeného transkriptu s imobilizovanou probou (plazmidem pSUBF) a bezfilmovou autoradiografií ukazují, že transkripce UBF mRNA proběhne a je prakticky ukončena v časně G1 fázi. Výsledky studia rychlosti translace proteinového produktu UBF pomocí metabolického značení [ $^{35}\text{S}$ ]metionin/cysteinem s následnou imunoprecipitací UBF, SDS PAG elektroforézou a bezfilmovou autoradiografií a dále pak pomocí stanovení hladin UBF vyhodnocením imunoblotů vizualizovaných technikou ECL<sup>+</sup> a kvantifikovaných užitím Fluor-S Multilmageru ukazují, že neosyntéza UBF probíhá



Obr. 1. Syntéza ribozomálního prekurzoru předchází S fází syntézu a aktivaci UBF. UBF mRNA je syntetizována v G1 fázi; ● syntéza DNA, ◆ syntéza rRNA, ■ syntéza UBF mRNA, ○ syntéza UBF, □ fosforylace UBF

současně s replikací chromozomální DNA, tedy prakticky výhradně během S fáze buněčného cyklu. Měření rychlosti fosforylace UBF kultivací buněk ve fosfát deficitním médiu obsahujícím [ $^{32}\text{P}$ ]ortofosfát, imunoprecipitací UBF následovanou SDS PAG elektroforézou a bezfilmovou autoradiografií gelů demonstrují, že fosforylace neosyntetizovaného UBF časově koreluje s jeho translací a probíhá tedy rovněž v S fázi buněčného cyklu (obr. 1).

Naše výsledky ukazují, že mitogenní transformací akcelerovaná syntéza ribozomálního prekurzoru v G1 fázi buněčného cyklu nevyžaduje zvýšení hladiny pozitivního regulátoru UBF. Je pravděpodobné, že pozitivní regulace využívá poolu UBF přítomného v klidových buňkách a některé naše předběžné výsledky naznačují, že k akceleračnímu efektu může přispívat aktivační fosforylace tohoto poolu v G1 fázi. Výsledky rovněž ukazují, že translace proteinového produktu UBF není regulována pouze na úrovni transkripce genu UBF ukončené v G1 fázi. Její počátek a signifikantní nárůst v S fázi svědčí pro následné regulační mechanismy.

## 20 DEVELOPMENTAL ALTERATIONS IN THE MEMBRANE-CYTOSOL BALANCE OF HETEROTRIMERIC G PROTEINS IN RAT VENTRICULAR MYOCARDIUM: INFLUENCE OF NEONATAL HYPO- AND HYPERTHYROIDISM

JIŘÍ NOVOTNÝ<sup>a</sup>, LENKA BOUŘOVÁ<sup>a</sup>, FRANTIŠEK KOLÁŘ<sup>b</sup>, and PETR SVOBODA<sup>a</sup>

Departments of <sup>a</sup>Biochemistry of Membrane Receptors and <sup>b</sup>Developmental Cardiology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Prague 4, Czech Republic

Heterotrimeric G proteins play a crucial role in transmitting information from agonist-activated serpentine receptors to cellular effectors<sup>1</sup>. Beside others they serve as important regulatory molecules in hormonal modulation of heart function<sup>2</sup>. Here we aimed to analyse the possible influence of altered thyroid status on subcellular distribution of G protein subunits in the developing rat heart.

The membrane and cytosolic fractions were prepared from homogenates of ventricular myocardium of immature (21-day-old) hypo- or hyperthyroid rats and adult (84-day-old) previously hypo- or hyperthyroid rats by a high-speed centrifugation ( $250000 \times g$ , 60 min) and analysed by immunoblotting with specific anti-G-protein antibodies<sup>3,4</sup> for the relative content of  $G_s\alpha$ ,  $G_i\alpha$ ,  $G_o\alpha$  and  $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ .

We have found that the total amount of myocardial  $G_s\alpha$  increased,  $G_i\alpha$  and  $G_o\alpha$  did not significantly change and  $G_q\alpha/G_{11}\alpha$  decreased in adult rats as compared to the levels of these G proteins in myocardia from immature animals. The cytosolic form of  $G_s\alpha$  represented roughly one third of the total amount of myocardial  $G_s\alpha$  in preparations from both immature and adult rats. The long ( $G_s\alpha L$ ) isoform was the major isoform of  $G_s\alpha$  found in membrane as well as cytosol preparations.

The total amounts of membrane-bound and cytosolic  $G_q\alpha$  proteins in myocardial preparations were very similar. Whereas there was no change in the level of myocardial  $G_i\alpha 1$ , we observed a decrease in membrane-bound  $G_i\alpha 2$  and increase in cytosolic  $G_i\alpha 2$  and  $G_i\alpha 3$  during maturation. The content of  $G_o\alpha$  did not significantly differ in immature and adult myocardia and the membrane localization slightly prevailed over the cytosolic one. Whereas all three isoforms of  $G_o\alpha$  ( $G_o\alpha 1$ ,  $G_o\alpha 2$  and  $G_o\alpha^*$ ) occurred in membranes, only  $G_o\alpha 1$  and  $G_o\alpha^*$  were detected in the cytosol.

$G_q\alpha$  and  $G_{11}\alpha$  associated with membranes represented the bulk of total myocardial  $G_q\alpha/G_{11}\alpha$  proteins and their amount decreased during postnatal development. In contrast, a relatively low level of cytosolic  $G_q\alpha$  increased in adult animals and there was no detectable  $G_{11}\alpha$  in the cytosol.

Neonatal hypo- or hyperthyroidism was found to be associated respectively with lower or higher expression of membrane-bound  $G_s\alpha L$  in immature rat myocardium. In parallel, neonatal hypothyroidism markedly increased the amount of membrane-bound  $G_o\alpha$  proteins and decreased cytosolic  $G_q\alpha$  in immature myocardium. On the other hand, neonatal hyperthyroidism decreased the levels of all three membrane-bound  $G_i\alpha$  isoforms and elevated cytosolic  $G_i\alpha 3$  in immature myocardium. Alterations in the content of myocardial G proteins in previously hypo- and hyperthyroid adult rats were vastly restored in adulthood to the levels of the corresponding control euthyroid animals.

Collectively, our present data provide evidence about unequal regulation of expression and subcellular localization of G protein isoforms during maturation of rat myocardium. In

addition, altered thyroid status was found to affect significantly expression and distribution of some G protein subunits especially in immature myocardium, what might at least partially explain altered heart function observed previously in these animals<sup>3</sup>.

*This work was supported by grants 305/00/1660 and 306/98/0470 from the Grant Agency of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Hamm H. E.: J. Biol. Chem. 273, 669 (1998).
2. Fleming J. W., Wisler P. L., Watanabe A. M.: Circulation 85, 204 (1992).
3. Novotný J., Bouřová L., Svoboda P., Kolář F.: J. Mol. Cell. Cardiol. 31, 761 (1999).
4. Bouřová L., Novotný J., Svoboda P.: J. Mol. Endocrinol. 23, 223 (1999).

## 21 ANALYSIS OF SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF THE LONG AND SHORT SPLICE VARIANTS OF $G_s\alpha$ PROTEIN IN THE DEVELOPING RAT CORTEX, THALAMUS AND HIPPOCAMPUS

IVANNA IHNATOVYCH<sup>a</sup>, JIŘÍ NOVOTNÝ<sup>b</sup>, RENATA HAUGVICOVÁ<sup>a</sup>, HANA KUBOVÁ<sup>a</sup>, PAVEL MAREŠ<sup>a</sup>, and PETR SVOBODA<sup>b</sup>

*Departments of <sup>a</sup>Developmental Epileptology and <sup>b</sup>Biochemistry of Membrane Receptors, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Prague 4, Czech Republic*

Heterotrimeric GTP-binding proteins (G proteins) function as key regulatory elements in signal transduction from hormone-activated plasma membrane-bound receptors to appropriate effector molecules<sup>1</sup>. In the present work developmental changes in the subcellular distribution of the long ( $G_s\alpha L$ ) and short ( $G_s\alpha S$ ) isoforms of the  $\alpha$  subunit of the stimulatory G protein ( $G_s$ ) were analysed in cortex, thalamus and hippocampus of 1-, 7-, 12-, 18-, 25- and 90-day-old rats. Membrane and cytosolic fractions were prepared by high-speed centrifugation ( $250000 \times g$ , 30 min) of homogenates obtained from the above mentioned brain regions and the

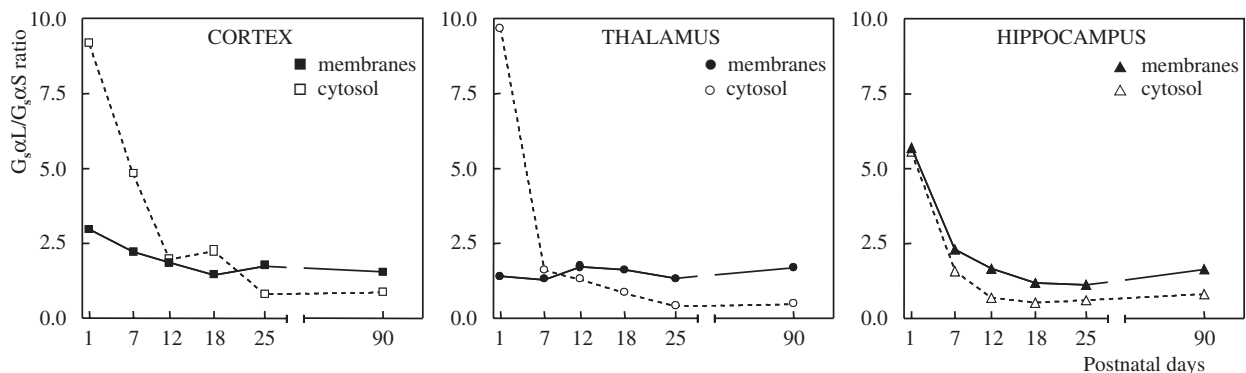


Fig. 1. Developmental changes in the  $G_s\alpha L/G_s\alpha S$  ratio in membrane and cytosolic fractions of rat cortex, thalamus and hippocampus

relative content of  $G_s\alpha$  was determined by immunoblotting using specific antisera<sup>2</sup>.

The total amount of  $G_sL\alpha$  and  $G_sS\alpha$  raised markedly (by about 200–500 %) in all tested brain regions between postnatal day (PD) 1 and 90. Whereas  $G_sL\alpha$  prevailed over  $G_sS\alpha$  in membrane fractions all the time and its amount in the cytosol did not dramatically change during postnatal development,  $G_sS\alpha$  was barely detectable in the cytosol shortly after birth, but then substantially increased and represented the dominant form of brain  $G_s\alpha$  in mature animals. The  $G_sL\alpha/G_sS\alpha$  ratio decreased between PD 1 and 90 from 2.97 to 1.56 and from 5.7 to 1.64 in membranes fractions of cortex and hippocampus, respectively, but remained almost constant in thalamus. More pronounced changes in the  $G_sL\alpha/G_sS\alpha$  ratio were detected in cytosolic fractions of all studied brain regions: decrease from 9.14 to 0.86, from 5.57 to 0.8 and from 9.7 to 0.45 in cortex, hippocampus and thalamus, respectively (Fig. 1).

This is the first demonstration of cytosolic forms of  $G_s\alpha$  protein in the brain. In addition, our results indicate that  $G_sL\alpha$  and  $G_sS\alpha$  proteins are expressed in the developing rat brain in a region- and age-specific manner what suggests that their roles might change during brain maturation.

*This work was supported by grants 305/00/1660 and 309/99/0207 from the Grant Agency of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Neer E.: Cell 80, 249 (1995).
2. Novotný J., Bouřová L., Málková O., Svoboda P., Kolář F.: J. Mol. Cell. Cardiol. 31, 761 (1999).

## 22 GETTING A CLUE TO THE ROLE OF PROTEIN SER/THR KINASES IN STREPTOMYCES

LINDA NOVÁKOVÁ, RICHARD NÁDVORNÍK, TOMÁŠ VOMASTEK, JIŘÍ JANEČEK, ZUZANA TECHNIKOVÁ, and PAVEL BRANNY

*Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vítěňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

Phosphorylation is a key component of a signal transduction network of both eukaryotic and prokaryotic cells. It has been thought for a long time that in prokaryotes the signal transduction processes are mediated mainly by two-component systems. Recent results, however, have shown the presence of a multigene family encoding eukaryotic-type protein Ser/Thr kinases in different bacteria, either in those displaying some kind of differentiation process, or in human pathogens. Recently, we have described three protein Ser/Thr kinases (Pkg2, 3 and 4) from actinomycete *Streptomyces granaticolor* all endowed with different properties. Analysis of PhoA fusion proteins suggested that Pkg2 is a transmembrane protein Ser/Thr kinase whereas the others are likely cytoplasmatic proteins. The N-terminal parts of Pkg4, 3 and 2 contain conserved catalytic domains of protein kinases and the C-terminal parts contain seven tandem repeats of 11 or 12 amino acids with similarity to the tryptophan-docking motif known to stabilize

a symmetrical three-dimensional structure called a propeller structure. When the *pkg2* and *pkg4* genes were expressed in *E. coli* the gene products have been found to be autophosphorylated at serine and threonine residues. In contrast, when *pkg3* was expressed in *E. coli*, no autophosphorylation was detected, either *in vivo* or *in vitro*. This unique feature gave rise to hypothesis that Pkg3 could be activated by another protein kinase, constituting a phosphorelay. The expression of the *pkg2*, 3 and 4 genes during the growth cycle of *S. granaticolor* was investigated using S1 nuclease analysis and at least *pkg2* seems to be developmentally regulated. Replacement of the *pkg2*, 3 and 4 genes resulted in changes both in the morphology of aerial hyphae and in the pattern of protein Ser/Thr phosphorylation in cell-free extracts of *S. granaticolor*. Some of the results indicated that Pkg2 and Pkg4 (3) share the same signalling pathway.

## 23 INCREASED ACTIVITY OF Akt KINASE IN v-src-TRANSFORMED CELLS

ZDENA TUHÁČKOVÁ, MARTINA VOJTĚCHOVÁ, EVA ŠLONCOVÁ, and VLASTA SOVOVÁ

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 37 Praha 6, Flemingovo n. 2, Czech Republic*

Translation of the specific subset of mRNAs that possess long highly structured 5' untranslated regions (5'UTRs), presumably encoding protein products of proto-oncogenes, oncogenes, transcription factors, growth factors and their receptors, is regulated at the level of translation initiation. Signal transduction pathway that can control several steps in mRNA translation in response to extracellular signals has been recently identified<sup>1</sup>. It is selectively inhibited by the immunosuppressant rapamycin.

Rapamycin blocks the formation of the functional mRNA cap-binding protein complex eIF4F, which consists of initiation factors eIF4E, eIF4A and eIF4G. The cap-binding protein eIF4E plays a central role in this complex and its activity is regulated by the translation repressor proteins 4E-BP1,2 (eIF4E-binding proteins) (Ref.<sup>2</sup>). The rapamycin-sensitive phosphorylation of 4E-BP1 disrupts its association with eIF4E and allows to form the functional eIF4F complex that may lead to upregulation of the cap-dependent translation, in particular, of mRNAs with structured 5'UTRs. This may result in increase in the rate of protein synthesis caused by an additional selective increase in the translation of such specific subset of mRNAs that are normally found in a translationally repressed state. Phosphorylation of the repressor protein 4E-BP1 thus potentially represents a powerful regulatory mechanism in the translational gene expression.

We have previously found that 4E-BP1 is highly phosphorylated in Syrian hamster fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus (RSV). This hyperphosphorylation of the translation repressor protein was only partially inhibited by rapamycin in RSV-transformed cells indicating that additional rapamycin-insensitive events are involved in the control of 4E-BP1 phosphorylation in these cells<sup>3</sup>.



We found that a distinct, rapamycin-insensitive signalling pathway PI-3'kinase/Akt, which also plays an important role in cell growth and proliferation, is activated in v-src-transformed cells. We examined therefore a possible involvement of this pathway in the regulation of the phosphorylation of 4E-BP1 in RSV-transformed hamster fibroblasts.

*This work was supported by the grants No. 301/00/0269 and 312/96/K205 from the Grant Agency of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Brown E. J., Schreiber S. L.: Cell 86, 517 (1996).
2. Lin T.-A., Kong X., Haystead T. A. Y., Pause A., Belsham G. J., Sonnenberg N., Lawrence J. C.: Science 266, 653 (1994).
3. Tuháčková Z., Sovová V., Šloncová E., Proud C. G.: Int. J. Cancer 81, 963 (1999).

## 24 PARADOXY EKTOPICKEJ APOPTÓZY V SACCHAROMYCES CEREVISIAE INICIOVANEJ BAX. PRAVDA A SKUTOČNOSŤ O „ZABÍJANÍ“ KVASINIEK PROAPOPTICKÝM BAX

VERONIKA FEKETE, MÁRIO ŠPÍREK  
a PAVOL SULO

*Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Spôsob signalizácie z mitochondrií do jadra nie je pravdepodobne sprostredkovaná proteínmi, ale skôr metabolickými signálmi. Tieto regulujú rôznymi spôsobmi expresiu mitochondriálnych proteínov z jadrových génov. Jediným známym prípadom signalizácie z mitochondrií, sprostredkovaný proteínmi, je proces programovanej smrti bunky. Apoptóza a degradácia jadrovej DNA je spúšťaná uvoľnením cytochrómu c z mitochondrií. Tento typ signalizácie by mohol byť pozostatkom pôvodného mechanizmu komunikácie prvotného endosymbionta, predchodcu súčasných eukaryotov. Podľa doterajších poznatkov expresia proapoptického BAX génu z rôznych cicavcov iniciuje apoptózu v kvasinkách, hoci vlastný prirodzený proces v nich nebol doteraz hodnoverne preukázaný.

Naše poznatky z expresie tohto proteínu pod indukovaným promótorom na epizomálnom plazmide poukazujú skôr na skutočnosť, že proteín kvasinky neusmrcuje, ale plazmid je z buniek špecificky eliminovaný. Tento proces je viazaný na delenie buniek. *Saccharomyces cerevisiae* sa s expresiou tohto toxického proteínu vyrovnávajú pomocou dominantných i recesívnych mutácií, pričom dominantné mutácie sú účinné len v respirujúcich kvasinkách. Z kvasinkových génov sme izolovali niekoľko supresorových génov, z ktorých jeden bol identifikovaný ako *XBPI*, transkripčný represor exprimovaný v podmienkach stresu. Nadexpresia BAX proteínu nespúšťa apoptické procesy, ale je pre kvasinky toxická, podobne ako nadexpresia iných vlastných i heterológnych proteínov.

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu VEGA 1/7310/20.*

## 25 EXPRESSION OF PROAPOPTOTIC PROTEINS IN NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA

EVŽEN KŘEPELA<sup>a</sup>, JAN PROCHÁZKA<sup>a</sup>,  
XIAOYI LIU<sup>a</sup>, ANNA KŘEPELOVÁ<sup>a</sup>,  
BOHDANA KÁROVÁ<sup>a</sup>, and JAN ČERMÁK<sup>b</sup>

*Departments of <sup>a</sup>Molecular and Cellular Pneumology and <sup>b</sup>Chest Surgery, Clinic of Pneumology and Chest Surgery, University Hospital Bulovka, Budínova 2, 180 81 Prague, Czech Republic*

The prerequisite condition for entry of cells into the process of apoptosis is their ability to express a specific assortment of proapoptotic proteins. Disruption of many vitally important cell functions and molecular assemblies, including the nuclear genome, during apoptosis is usually the result of a coordinate, rapid and robust activation of a functionally latent community of intracellular protein molecules including procaspase (procasp) -9, -8, -3, -7 and -6, the apoptosis-protease activating factor-1 (Apaf-1), and the DNA fragmentation factor (DFF)<sup>1-5</sup>. To date there is evidence that tumor cells of epithelial origin can develop defects in expression of some apoptosis-associated procaspases<sup>6-8</sup> and/or can down-regulate their activation<sup>9-11</sup>. This makes such tumor cells highly resistant toward a variety of apoptosis inducing signals that they encounter during growth and dissemination.

In the present work we examined expression of seven proapoptotic proteins in a panel of non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines and in NSCLC tissues and lung parenchyma from surgically treated patients. We found by means of SDS-PAGE and Western blot analysis (WBA) with specific antibodies that procasp-9, -8, and -3, and DFF45, i.e. the larger subunit of DFF, were expressed in all examined NSCLC cell lines and tissues and in the lungs. Procasp-6, Apaf-1 and DFF40, i.e. the smaller subunit of DFF, were also expressed in NSCLC cell lines, albeit at variable levels. Procasp-3 from NSCLC cell lines, NSCLC tissues and lungs could be processed to casp-3 by granzyme B (GRB) or recombinant casp-8 as shown by SDS-PAGE and WBA revealing the presence of both the large and the small casp-3 subunits. With using SDS-PAGE and WBA we also demonstrated that DFF45 from NSCLC tissues was cleavable to several polypeptide fragments by recombinant casp-3. The level of procasp-3 in NSCLC tissues was significantly higher compared to matched lungs. This result was confirmed by an activation assay with using GRB which showed that the GRB-generated casp-3 activity, measured with Ac-DEVD-AFC as the substrate, was significantly higher in NSCLC tissues than in the lungs, both in the absence and the presence of dithiothreitol (DTT). However, in the absence of DTT some tumors displayed lower GRB-generated casp-3 activity than matched lungs. In the presence of DTT, the GRB-generated casp-3 activities in extracts from NSCLC cell lines and NSCLC tissues were not significantly different. Casp-3 activity could be induced in cytosols from NSCLC cells by addition of both cytochrome c (cyt c) and dATP. The induction of casp-3 activity was inhibitable by Ac-LEHDal, an inhibitor of casp-9, and by different detergents. Compared to the levels of casp-3 activity that was generatable in extracts and cytosols from NSCLC cells by GRB or by cyt c and dATP, only very low or no casp-3 activity

was induced in NSCLC cells growing in culture after treatment with staurosporine or an anti-Fas agonistic antibody. We found also only very low levels of oligonucleosomal type of genomic DNA fragmentation after treatment of NSCLC cells with the mentioned apoptosis inducers. Taken together, the present study shows that NSCLC cells express a set of key proapoptotic proteins which are activatable but sheltered from activation in intact tumor cells exposed to apoptotic stimuli.

*Supported by a grant (no. NC/4963-3) from the Ministry of Health, Czech Republic.*

## REFERENCES

- Nicholson D. W.: Cell Death Differ. 6, 1028 (1999).
- Salvesen G. S., Dixit V. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 96, 10964 (1999).
- Saleh A., Srinivasula S. M., Acharya S., et al.: J. Biol. Chem. 274, 17941 (1999).
- Rodriguez J., Lazebnik Y.: Genes Dev. 13, 3179 (1999).
- Liu X., Li P., Widlak P., et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 95, 8461 (1998).
- Jänicke R. U., Sprengart M. L., Wati M. R., et al.: J. Biol. Chem. 273, 9357 (1998).
- Kolenko V., Uzzo R. G., Bukowski R., et al.: Cancer Res. 59, 2838 (1999).
- Joseph B., Ekedahl J., Sirzen F., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 262, 381 (1999).
- Cardone M. H., Roy R., Stennicke H. R., et al.: Science 282, 1318 (1998).
- Izawa M., Mori T., Satoh T., et al.: Apoptosis 4, 321 (1999).
- Tamm I., Wang Y., Sausville E., et al.: Cancer Res. 58, 5315 (1998).

## 26 INTERACTION OF DNA WITH CATIONIC SURFACTANTS AND LIPOSOMES

DANIELA UHRÍKOVÁ<sup>a</sup>, IGOR ZAJAC<sup>a</sup>,  
ŠTEFAN VIDLÁR<sup>a</sup>, GERT RAPP<sup>b</sup>,  
and PAVOL BALGAVÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Katedra fyzikálnej chémie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovakia,* <sup>b</sup>*EMBL Outstation at DESY, Notkestr. 85, 22603 Hamburg, Germany*

In the last few years gene therapy has received significant attention. The development of new techniques for transferring genes into living cells allowed for the potential treatment of several diseases of genetic origin<sup>1</sup>. The central problem of gene therapy is the development of safe and efficient gene delivery system. Since both the DNA and the cell membranes are negatively charged, the naked polynucleotides are electrostatically prevented from entering inside cells. Furthermore, the unprotected DNA is rapidly degraded by nucleases present in plasma<sup>1</sup>.

In the non-viral category of gene delivery systems, the DNA-liposome complexes have shown the most promise. Cationic liposomes can associate with the DNA segments, neutralizing or even inverting the electric charge of nucleotides, thus significantly increasing the efficiency of gene adsorption and transfection by cells. As the cationic surfactant is

added to the solution containing DNA, a cooperative binding of surfactant to the DNA molecules is observed<sup>2</sup>. This binding is strongly dependent on the concentration of the salt and on the hydrophobicity of the surfactant molecules. Kuhn et al.<sup>3</sup> have shown, that for amphiphile which are sufficiently hydrophobic, a charge neutralization, or even charge inversion of the complex is possible. The charge inversion could, in principle, allow the DNA-surfactant complex to approach negatively charged cell membranes permitting the transfection to take place.

The aim of present work is to study the interaction of DNA with surface active *N,N'*-bis(alkyldimethyl)-1,4-butane-diammonium dibromides (CnBAS, n = 12, 13 and 16 is the number of carbons in alkyl chains) in the presence or absence of multilamellar dilauroylfosfatidylcholine (DLPC) dispersion. The CnBAS gemini surfactants are powerful bactericidal agents<sup>4</sup>.

The interaction between DNA and CnBAS (n = 12, 13, 16) was followed using changes in transmittance (at  $\lambda = 450$  nm) of DNA+CnBAS mixture. The transmittance decrease was observed in dependence on both the CnBAS concentration and on the length of alkyl substituents. The increase of CnBAS hydrophobicity leads to the transmittance decrease at lower concentrations. After reaching a saturation level of DNA, DNA+CnBAS aggregates precipitate. The change in size of DNA+CnBAS (n = 12, 16) aggregates with increasing concentration of CnBAS was observed by using dynamic light scattering. In the concentration range below the critical micellar concentration of surfactant, the diameter of DNA+CnBAS aggregates decreases with increasing CnBAS concentration. Above the micellar concentration a slight increase of the diameter of DNA+CnBAS aggregates was observed. Small angle x-ray (SAX) diffraction pattern of DNA+C13BAS precipitate displays one broad reflection with the maximum at  $s = 0.264 \text{ nm}^{-1}$  and inconspicuous shoulder at  $s = 0.353 \text{ nm}^{-1}$ . We suppose that the DNA+C13BAS aggregate has an ordered structure with periodicity  $d = 3.8 \text{ nm}$  in one dimension.

In the presence of liposomes at equimolar DNA base:lipid ratio, the decrease of transmittance with increasing CnBAS concentration was observed at significantly lower concentration of CnBAS (Ref.<sup>5,6</sup>). The aggregation is a result of interaction of DNA with bisalkylammonium ions incorporated into lipid bilayer of liposomes. The structure of DNA:DLPC: C12BAS = 1:1:0.5 (mol base/mol/mol) complex was determined from SAX diffraction pattern. Three peaks observed in the SAX region at  $s = 0.179, 0.347$  and  $0.514 \text{ nm}^{-1}$  were indexed as  $h = 1, 2$  and  $3$  reflections, respectively, due to stacking of lipid bilayers in a lamellar phase, and the reflection at  $s = 0.285 \text{ nm}^{-1}$  was ascribed in analogy to DNA – cationic liposome complexes<sup>7</sup> to the reflection of parallel DNA chain intercalated in the aqueous layers of lamellar stacks of DLPC bilayers. The lamellar repeat period  $d = 5.86 \text{ nm}$  of lipid and the spacing between DNA strands  $d_{\text{DNA}} = 3.50 \text{ nm}$  were determined from these reflections.

*This study was supported by the Slovak Ministry of Education Grant Agency and by the European Union Human Capital and Mobility (Large Installations) Programme.*

## REFERENCES

- Hope M. J., Mui B., Ansell S., Ahkong Q. F.: Mol. Membr. Biol. 15, 1 (1998).

2. Hayakawa K., Santerre J. P., Kwak J. C. T.: *Biophys. Chem.* 17, 175 (1983).
3. Kuhn P. S., Levin Y., Barbosa M. C.: *Physica A*, 274, 8 (1999).
4. Devínsky F., Lacko I., Mlynarčík D., Račanský V., Krasnec L.: *Tenside Deterg.* 22, 10 (1977).
5. Horniak L., Balgavý P.: *Studia Biophys.* 124, 61 (1988).
6. Uhríková D., Vidlár Š., Dubničková M., Balgavý P.: *Adv. in Med. Phys. Bioph. and Biomat., book of abstract* (Kukurová E., ed.), p. 40. Bratislava 1977.
7. Rädler J. O., Koltover I., Salditt T., Safinya C. R.: *Science* 275, 810 (1997).

## 27 NÁSLEDKY, PRAVIDLÁ A LIMITY VÝMENY VLASTNÝCH MITOCHONDRÍÍ ZA MITOCHONDRIE Z INÝCH DRUHOV

PAVOL SULO, MÁRIO ŠPÍREK,  
ANDREA ŠOLTÉSOVÁ a ANTON HORVÁTH

*Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Na biogenézu funkčných mitochondrií okrem produktov vlastného genómu je potrebných niekoľko stovák proteínov kódovaných jadrom. Pravdepodobne len niekoľko z nich zabezpečuje synchronizáciu biogenézy mitochondrií s ostatnými časťami bunky. Na osvetlenie týchto komunikačných uzlov sme sa pokúsili pomocou fúzie protoplastov zameniť pôvodný mitochondriálny genóm kvasiniek za mitochondriálnu genetickú informáciu iných druhov. Niektoré z týchto xenomitochondriálnych cybridov by mohli vykazovať odlišné chovanie spôsobené prítomnosťou nových mitochondrií. Tieto organely z kvasiniek považovaných v súčasnosti ako synonymá k *Saccharomyces cerevisiae*, i napriek rozdielom v organizácii mitochondriálneho genómu (*S. italicus*, *oviformis*, *chevalieri*, *capensis*), môžu úplne nahradiť pôvodné mitochondrie. Mitochondrie z najpríbuznejšieho druhu (*S. douglasii*) dokážu nahradiť mitochondrie v *S. cerevisiae* len po niekoľkotýždňovej adaptácii a len do určitej miery. Naopak mitochondrie zo *S. cerevisiae* dokážu úplne kooperovať z jadrami nielen sesterských kvasiniek, ale aj z jadrami príbuzných no bezpochyby odlišných druhov (*S. douglasii*, *S. paradoxus*). Identifikovali sme niekoľko jadrových génov (*MRP13*, *MRS3*, *MRS4*) a oblasť mitochondriálnej DNA sprostredkujúcej adaptáciu a kompatibilitu *S. cerevisiae* s cudzími mitochondriami. Neobyčajným dôsledkom adaptácie je strata schopnosti rásť pri zvýšenej teplote, ktorá ostáva zachovaná aj v prípade, že mitochondriálny genóm je z buniek odstránený. Zdá sa, že bariérou inkompatibility je neschopnosť replikačnej mašínérie replikovať cudziu mtDNA. Xenomitochondriálne cybridy považujeme nielen za nástroj štúdia eukaryotickej komunikácie, ale aj ako užitočné taxonomické kritérium. Tiež očakávame, že by mohli poskytnúť dôležité údaje na riešenie paradoxu mitochondrií, ktorý sa javí krucálnym problémom pri obnove vyhynulých druhov (experimentoch typu Jurský park) klonovaním.

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu VEGA 1/7310/20.*

## 28 RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELL GROWTH AND PROLIFERATION – APPLICATION TO PROLIFERATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

ANNA SOBEKOVÁ and JÁN BLAHOVEC

*Katedra chémie, biochémie a biofyziky, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic*

The determination of cellular viability, activation and proliferation are useful in many biological approaches. The classical and the most frequently used method for determination of cell proliferation is based on the incorporation of radiolabelled nucleotides into DNA. Need for scintillation counter, handling of toxic scintillation fluid and breakdown of [<sup>3</sup>H]-thymidine are generally known disadvantages of this procedure. Recently, several groups have described alternative methods utilizing nonradioactive substances which are metabolized to coloured product by the cells. The amount of originated colour product is proportional to the number of viable cells and it is determined spectrophotometrically<sup>1,2</sup>.

In the present study tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) was used. This dye was till now employed largely for quantitative determination of cellular proliferation of different cell lines, but by our knowledge, not for cell culture of peripheral blood cells. Moreover experiments, where radioactive substances were used for kinetics studies of growth of these cells, provided diverse results<sup>3</sup>. Hence we tried to adapt MTT method for our experimental conditions, where bovine peripheral blood lymphocytes were used as a target cells.

Cell preparation: Heparinized blood from healthy cows was layered on to Histopaque 1077 and centrifuged at 400 g for 30 minutes. Cells at the interface were removed and washed twice in non-complete RPMI-1640 medium (RPMI-1640 with 100 units penicillin plus 100 µg streptomycin per 1 ml and without fenol red). Lymphocytes were resuspended in complete culture medium (non-complete RPMI-1640 medium plus 2 mmol.l<sup>-1</sup> of glutamine) at a concentration 3.5×10<sup>6</sup> cells.ml<sup>-1</sup>. Viability of the cells was assessed by exclusion of trypan blue dye (>95 %).

Mitogen-induced proliferation of peripheral blood lymphocyte: Isolated lymphocytes (880 µl) suspended in complete culture medium were added in triplicate to 24-well flat-bottom plates. Some wells were supplemented with 10 % of fetal calf serum. Employed mitogens were diluted in complete culture medium and appropriate concentration (5–25 µg.ml<sup>-1</sup>) of concanavalin A (ConA) and phytohemagglutinin (PHA) was added to some wells. Complete culture medium was then added, with a final volume of 1 ml per well.

MTT colorimetric assay: Cells were incubated for 48 or 72 hours (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). After the incubation, 100 µl of MTT solution (5 mg MTT per ml of PBS) was added to each well. Plates were incubated an additional 4 hours under the same conditions and then 1 ml of solubilization solution (10 % SDS in 0.01 mol.l<sup>-1</sup> HCl) was added into each well. The micro-plates were standed overnight in incubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). The amount of solubilized formazan product was measured spectrophotometrically at 550 nm.



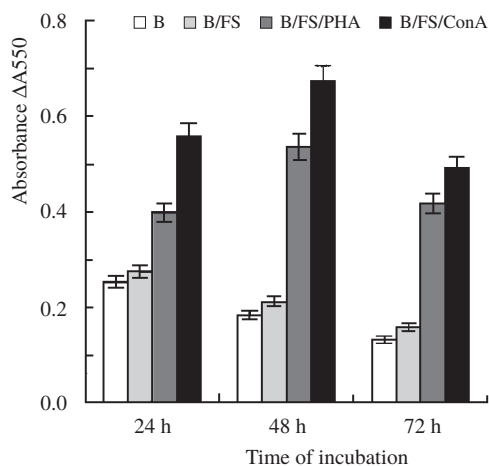


Fig. 1. Proliferation of peripheral blood lymphocytes in response to non-specific lymphocyte mitogens and to time of incubation. Results are shown as the means and standard deviation of 3 replicates; B – cells in complete medium, B/FS – cells in medium supplemented with fetal calf serum, B/FS/PHA or B/FS/ConA – cells in complete medium supplemented with fetal calf serum and with appropriate mitogen at concentration  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

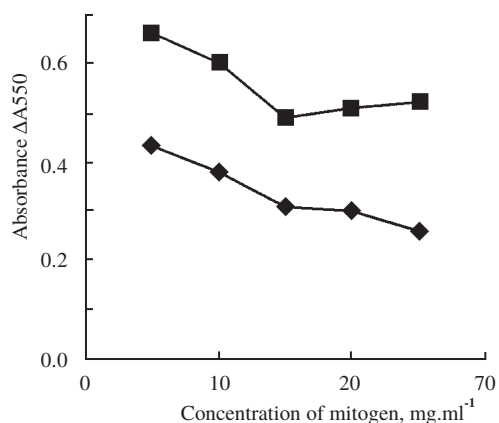


Fig. 2. Mitogen-induced proliferation of bovine peripheral blood lymphocytes stimulated with varying concentration of PHA and ConA for 48 hours. Results are shown as the means of 3 replicates per point. Background values, obtained from wells with cells but no mitogens, were subtracted from all points

Lymphocytes from the peripheral blood appear *in vivo* as quiescent, non-proliferating cells, but they are able to proliferate in the presence of appropriate mitogens. In this study we used non-specific polyvalent mitogens of lymphocytes – PHA and ConA to evaluate a convenience of application of MTT method to pursue peripheral blood lymphocytes (PBL) surveillance to substances with potential mitogenic effect. The results in Figure 1 show apparent effect of employed mitogens on proliferation of bovine PBL. On the other hand, it is evident that viability of the cells go down after 48 hours of incubation if cells are incubated without mitogens. Loss of viability after 72 hour of incubation, even in the presence of mitogens, was also observed by Gilles et al. when spleen cells were used<sup>4</sup>.

Mitogenic effect of various concentrations of PHA and ConA on proliferation of bovine peripheral blood lymphocytes

is shown on Figure 2. It is seen that in the range of concentration from 5 to  $25 \mu\text{g}$  per ml the proliferation slowly decrease and optimal concentration for both mitogens is  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

This work was supported by grant 1/5150-98.

## REFERENCES

1. Mosmann T. J.: Immunol. Methods 65, 55 (1983).
2. Ohno M., Abe T. J.: Immunol. Methods 145, 199 (1991).
3. Marakhova I. I.: Cytologija 33, 67 (1991).
4. Gillis S., Ferm M. M., Ou W., Smith K. A.: J. Immunol. 120, 2027 (1978).

## 29 OBSAH TRIACYLGLYCEROLOV A VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELÍN V PEČENI A KOSTROVOM SVALE POTKANOV S DIETETICKY INDUKOVANOU INZULINOREZISTENCIOU

EDITA DEMČÁKOVÁ, PAVOL BOHOV,  
JOZEF UKROPEC, IWAR KLIMEŠ  
a ELENA ŠEBŔKOVÁ

Laboratórium diabetu a výživy, Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika

Inzulínová rezistencia sa spája so situáciami charakterizovanými nadbytkom lipidov, či už vo forme zvýšených hladín voľných mastných kyselín a triacylglycerolov v cirkulácii alebo vo forme zvýšenej akumulácie triacylglycerolov v tkanivách<sup>1</sup>. Farmakologické a diétne zásahy, vedúce k zníženej ponuke lipidov, obvyčajne priaznivo ovplyvňujú účinok inzulínu. Z diétnych preparátov významné miesto patrí dlhoreťazcovým n-3 PNMK a tio-substituovaným mastným kyselínám.

Cieľom práce bolo indukovať inzulínovú rezistenciu u experimentálnych zvierat podávaním vysokosacharózovej (VS, 63 kal% sacharózy) a vysokotukovej diéty (VT, 70 kal% tuku) a sledovať účinok rybieho oleja (RO) bohatého na n-3 PNMK a tetradecyltiooctovej kyseliny (TTA) na hladiny triacylglycerolov (TG) a voľných mastných kyselín (VMK) v pečeni a kostrovom svale potkanov vo vzťahu ku hladinám lipidov v cirkulácii.

Stanovenie TG a VMK v chloroformových extraktach tkanív a v sére sa robilo enzymaticky modifikovanou kolorimetrickou metódou s využitím komerčne dostupných kitov (fy Boehringer Mannheim, Nemecko na stanovenie TG a fy Randox, Veľká Británia na stanovenie VMK).

Konzumácia VS a VT diéty viedla k zvýšeným hladinám TG v cirkulácii, pričom tento účinok bol výrazne vyšší v nasýtenom stave (PD:  $2,3 \pm 0,3$ , VS:  $3,1 \pm 0,3$ , VT:  $4,2 \pm 0,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) ako nalačno (PD:  $0,8 \pm 0,2$ , VS:  $1,2 \pm 0,1$ , VT:  $0,7 \pm 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Obohatenie diét o RO a TTA sa prejavilo znížením cirkulujúcich hladín TG v nasýtenom stave (VSRO:  $1,3 \pm 0,3$ , VSTTA:  $1,8 \pm 0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; VTRO:  $1,2 \pm 0,2$ , VTTTA:  $0,8 \pm 0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) aj nalačno (VSRO:  $0,5 \pm 0,0$ , VSTTA:  $0,9 \pm 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; VTRO:  $0,4 \pm 0,0$ , VTTTA:  $0,5 \pm 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $p > 0,05$ ) pri oboch modeloch inzulínorezistencie až na úroveň kontrol. Na druhej strane, zmeny v obsahu VMK v cirkulácii po konzumácii VS a VT diéty boli menej výrazné v nasýtenom



stave (PD:  $0,6 \pm 0,0$ , VS:  $0,5 \pm 0,0$ , VT:  $0,6 \pm 0,0$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ) ako nalačno (PD:  $0,5 \pm 0,1$ , VS:  $0,8 \pm 0,0$ , VT:  $1,1 \pm 0,1$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ). Obe hypolipidemicky pôsobiace látky, RO i TTA viedli k normalizácii hladín VMK nalačno (VSRO:  $0,5 \pm 0,1$ , VSTTA:  $0,5 \pm 0,0$  mmol.l<sup>-1</sup>; VTRO:  $0,7 \pm 0,1$ , VTTTA:  $0,6 \pm 0,1$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ) i v nasýtenom stave (VSRO:  $0,4 \pm 0,0$ , VSTTA:  $0,4 \pm 0,0$  mmol.l<sup>-1</sup>; VTRO:  $0,4 \pm 0,0$ , VTTTA:  $0,4 \pm 0,0$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ). V pečeni experimentálnych zvierat došlo po kŕmení VS a VT diétou k akumulácii TG (PD:  $8,7 \pm 0,6$ , VS:  $17,4 \pm 2,8$ , VT:  $39,7 \pm 6,6$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ), pričom sa v tomto prípade potvrdil hypolipidemický účinok RO a TTA (VSRO:  $10,7 \pm 1,5$ , VSTTA:  $12,8 \pm 1,8$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ; VTRO:  $14,4 \pm 2,4$ , VTTTA:  $19,3 \pm 1,4$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). V kostrovom svale bola situácia opačná, konzumácia VS a VT diéty viedla k zníženiu obsahu TG (PD:  $5,9 \pm 1,1$ , VS:  $5,0 \pm 0,7$ , VT:  $5,4 \pm 0,6$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Obohatenie diét o RO a TTA sa neprejavilo výraznými účinkami na obsah TG (VSRO:  $4,3 \pm 0,3$ , VSTTA:  $6,8 \pm 0,9$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,5$ ; VTRO:  $7,0 \pm 1,0$ , VTTTA:  $6,0 \pm 1,2$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Konzumácia VT diéty viedla k výraznej akumulácii VMK v pečeni, zatiaľ čo obsah VMK po VS diéte sa prakticky nemenil (PD:  $0,8 \pm 0,1$ , VS:  $0,9 \pm 0,2$ ; VT:  $4,2 \pm 1,1$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Podobne aj pokles obsahu VMK v pečeni účinkom RO a TTA bol významný len u VT diéty indukovanej inzulínrezistenciou (VSRO:  $0,7 \pm 0,2$ , VSTTA:  $0,7 \pm 0,1$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ; n.s. VTRO:  $0,7 \pm 0,2$ , VTTTA:  $0,8 \pm 0,1$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Obsah VMK v kostrovom svale sa významne nemenil po žiadnej z podávaných diét.

Zistené zmeny v hladinách VMK a TG ukazujú, že a) narušenie metabolizmu nepolárnych lipidov pri diétou indukovanej IR je prítomné predovšetkým na úrovni pečene-krv, b) napriek ich zvýšenej ponuke v cirkulácii nedochádza v kostrovom svale za kludového režimu k akumulácii neutrálnych lipidov a c) výsledky ďalej potvrdili priaznivý vplyv rybieho oleja bohatého na n-3 PNMK aj TTA na metabolizmus neutrálnych lipidov.

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu VEGA 2-721020.*

## LITERATÚRA

1. Storlien L. H., Baur L. A., Kriketos A. D., Pan D. A., Cooney G. J., Jenkins A. B., Campbell L. V.: *Diabetologia* 39, 621 (1996).

### 30 HYPOTRIACYLGLYCEROLEMICKÝ ÚČINOK RYBIEHO OLEJA SA SPÁJA SO ZVÝŠENÍM OXIDÁCIE MASTNÝCH KYSELÍN

JOZEF UKROPEC, IWAR KLIMEŠ,  
DANIELA GAŠPERÍKOVÁ a ELENA ŠEBÖKOVÁ

*Laboratórium diabetu a výživy, Ústav experimentálnej endokrinológie, SAV, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovensko*

Rozvoj hypertriacylglycerolémie a inzulínrezistencie sa dáva do súvislosti s poruchou mitochondriálnej oxidácie mastných kyselín<sup>1</sup>. Karnitín palmitoyl transferáza-I (CPT-I) sa považuje za kľúčový enzým pri transporte mastných kyselín (MK) do mitochondrií, čím determinuje rýchlosť ich oxidácie. Malonyl-CoA, medziprodukt syntézy MK, silne inhibuje CPT-I

a teda oxidáciu MK v pečeni i v kostrovom svale<sup>2</sup>. Dlhoreťazcové n-3 polynenasýtené mastné kyseliny (n-3 PNMK) z rybieho oleja pôsobia hypotriacylglycerolemicky<sup>3</sup> pričom mechanizmus tohto pôsobenia nie je celkom objasnený.

Cieľom práce bolo preto sledovať vplyv rybieho oleja na oxidáciu mastných kyselín ako aj na aktivitu CPT-I v pečeni a v kostrovom svale. Súčasne sa sledoval aj účinok malonyl-CoA na aktivitu CPT-I v oboch vyššie uvedených tkanivách, u zdravých potkanov i potkanov s dieteticky-indukovanou hypertriacylglycerolémiou.

Samci potkanov kmeňa Wistar sa 21 dní kŕmili bazálnou (PD) alebo vysokotukovou (VT 70 kal%) diétou, pričom polovica zvierat z každej skupiny (PD,VT) mala diétu obohatenú o rybí olej (RO, n-3 PNMK 10 hm.%). Oxidácia mastných kyselín sa stanovila rádiometricky v hrubej mitochondriálnej frakcii pečene a svalu, pomocou rádioaktívne značeného 1-<sup>14</sup>C-palmitoyl-CoA. Množstvo vznikajúceho 1-<sup>14</sup>C-acetyl-CoA sa meralo ako aktivita produktu rozpustného v kyseline. Aktivita karnitín palmitoyl transferázy-I sa stanovila v tkanivovom extrakte z pečene a svalu pomocou <sup>14</sup>C L-karnitínu a palmitoyl-CoA ako množstvo vznikajúceho acyl-<sup>14</sup>C karnitínu. Zároveň sa sledovalo inhibičné pôsobenie 20 mM malonyl-CoA na aktivitu CPT-I.

Vysokotuková diéta neovplyvnila oxidáciu palmitoyl-CoA (sval: PD:  $57,0 \pm 10,0$  vs. VT:  $64,9 \pm 12,5$   $\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ; pečeň: PD:  $226,6 \pm 8,2$  vs. VT:  $187,4 \pm 59,2$   $\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p = \text{N.S.}$ ). Naproti tomu bola aktivita CPT-I, účinkom VT diéty zvýšená tak v kostrovom svale (CPT-I, PD:  $0,25 \pm 0,02$  vs. VT:  $0,44 \pm 0,04$   $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) ako aj v pečeni (CPT-I, PD:  $1,02 \pm 0,04$  vs. VT:  $2,34 \pm 0,16$   $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Citlivosť CPT-I na malonyl-CoA nebola významne zmenená v žiadnom zo sledovaných tkanív.

Obohatenie diéty RO viedlo k zvýšeniu oxidácie palmitoyl-CoA v oboch sledovaných tkanivách – vo svale (VT+RO:  $174,5 \pm 21,3$   $\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) i v pečeni (VT+RO:  $585,1 \pm 28,9$   $\mu\text{mol.mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Našlo sa tiež zvýšenie aktivity CPT-I v kostrovom svale (CPT-I, PD+RO:  $0,51 \pm 0,03$  a VT+RO:  $0,84 \pm 0,11$   $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Avšak aktivita CPT-I (VT+RO:  $2,43 \pm 0,01$   $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) ani citlivosť CPT-I na malonyl-CoA sa v pečeni zvierat s dieteticky indukovanou inzulínrezistenciou nezmenila. U zdravých (kontrolných) zvierat sa obohatenie diéty rybím olejom prejavilo zvýšením aktivity CPT-I (PD+RO:  $1,72 \pm 0,09$   $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ).

Výsledky ukázali, že hypotriacylglycerolemický účinok n-3 PNMK je sprevádzaný zvýšením oxidácie MK v pečeni i v kostrovom svale. Aktivita CPT-I sa po diéte s vysokým obsahom nasýtených mastných kyselín dvojnásobne zvyšuje v pečeni i vo svale. Prítomnosť RO v diéte ju však ďalej nemení (pečeň) alebo len nepatrne zvyšuje (kostrový sval). Z toho možno usudzovať, že obohatenie vysokotukovej diéty rybím olejom vedie k zvýšeniu mitochondriálnej oxidácie MK v pečeni i kostrovom svale, avšak rýchlosť transportu MK cez mitochondriálnu membránu sa pritom nemení.

*Za čiastočnú finančnú podporu autori ďakujú grantu VEGA 2-721020.*

## LITERATÚRA

1. Froyland L., Madsen L., Vaagenes H., et al.: *J. Lipid Res.* 38, 1851 (1997).

2. McGarry J. D., Mills S., Long S., Foster D. W.: *Biochem. J.* 241, 21 (1983).
3. Herold P. M., Kinsella J. E.: *Am. J. Nutr.* 43, 566 (1986).

### 31 EFFECT OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS NO ON UREA SYNTHETIC CAPACITY IN ISOLATED PERFUSED HEPATOCYTES

EVA KMONÍČKOVÁ, LUDMILA KAMENÍKOVÁ,  
PETRA STŘEŠTÍKOVÁ, and HASSAN FARGHALI

*Charles University, First Faculty of Medicine, Institute of Pharmacology, Albertov 4, 128 00 Prague 2, Czech Republic*

In spite of the fact that during the last twenty years research on nitric oxide (NO) has resulted in identifying that NO is a functional messenger in several physiological processes as neurotransmission, vasodilatation and immune response, it is only during the few years, NO was identified as important signal molecule in the liver. Experiments dealing with NO modulatory effect on hepatocyte urea synthetic capability represent an important step towards preserved hepatocyte-specific functions that are essential for keeping this cellular model as physiologically active as possible. Indeed, urea synthesis is a highly demanding energy process, where one molecule of urea needs 4 equivalents of ATP and also requires precisely organized movements of intermediates between cytoplasmic and mitochondrial compartments. Moreover NO is synthesized by a family of enzymes that are collectively called nitric oxide synthase (NOS) which employs L-arginine as a substrate and requires other cofactors with the production of L-citrulline. This occurs as part of the integrated urea cycle and the NO pathway. We have recently gave preliminary results that exogenous NO modulates the rate of urea production by isolated rat hepatocytes. Experiments done by other authors demonstrated that NO did possess double face effect by either reducing or increasing the rate of urea synthesis in hepatocytes.

On the base of above findings, the aim of the present study was to further investigate the effects of NO on the rate of urea synthesis using isolated perfused hepatocytes (bioreactor model), which is used routinely at our laboratory. Specifically, with the use of perfused rat hepatocytes, the purpose of this study was to: 1) characterise the role played by endogenous NO induced by lipopolysaccharide (LPS) injection to rats followed by hepatocyte isolation on urea synthesis; 2) determine the role played by inhibition of iNOS on urea synthesis; and 3) compare the results with exogenously delivered NO to hepatocytes through NO donors.

Isolated hepatocytes were prepared by standard methods either from control male Wistar rats injected with saline solution (control) or rats injected with LPS (5 mg.kg<sup>-1</sup> i.p). 18 hours later hepatocytes were isolated and the immobilization of hepatocytes in low temperature gelling agarose threads and the subsequent perfusion with Williams E medium was done according to Farghali et al.<sup>1</sup> The functional integrity and metabolic competence of the hepatocytes was evaluated by assessing the time course of lactate dehydrogenase leakage

from the immobilized hepatocytes, rate of oxygen consumption of the cells and the time course of urea synthesis into the perfusate. To inhibit iNOS production the phosphatase (calcineurin) inhibitor tacrolimus (FK 506 0.3 mg.kg<sup>-1</sup>) was given i.p. before LPS and urea synthesis was followed. In some experiments the immobilized hepatocytes were preincubated with sodium nitroprusside (SNP 0.2 mmol.l<sup>-1</sup>) or S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP 0.2 mmol.l<sup>-1</sup>) and the time course of urea synthesis was followed up.

The rate of urea synthesis was significantly reduced by LPS administration at all time intervals tested. Four hours after hepatocyte perfusion the cumulative urea synthesis was 5.5±0.2 mg/100 ml of the perfusate in control hepatocytes as compared to 4.0±0.2 mg/100 ml cumulative synthesis by hepatocytes isolated from LPS treated rats. The coadministration of tacrolimus, though did not affect the final absolute amount of urea after 4-hours perfusion, the rate of urea synthesis was increased more than two-fold during the perfusion time (600 % increase in LPS-treated rats as compared to 1700 % increase in tacrolimus-pretreated rats). The delivery of NO through the donors SNP or SNAP decreased the rate of urea synthesis in all types of experiments performed.

It seems that stimulation of iNOS by LPS with the consequent production of NO is followed by inhibition of urea synthesis. It is well established that tacrolimus is a phosphatase inhibitor in T-cells and we found that it inhibits the iNOS mRNA in rat peritoneal macrophages by using RT PCR technique. The inhibitory effect of LPS induced iNOS on urea synthesis apparently was reversed by tacrolimus. Moreover NO exogenously delivered also inhibited the urea production.

Our results are in agreement with our previous<sup>2</sup> and other studies<sup>3</sup> which reported that NO production in the differentiation process of human hepatocytes by butyrate may play a role in suppressing butyrate-induced urea-synthesis capacity. However, it should be indicated that endogenous arginine synthesizing and arginine degrading enzymes regulate NO synthesis by a very complicated process. The reduction of urea synthesis by hepatocytes under endogenous or exogenous provision of NO, may indicate a novel negative feedback mechanism whereby NO downregulates one or more of urea cycle enzyme gene expression or reduces the activity of one or more of these enzymes by simple nitrosylation of an active site. However, the practical implication of the effect of NO inhibitory effect on hepatocytes urea synthesis remains to be clarified.

*This work was supported by research grants from GA ČR 305/00/1129, IGA MZ NL/5885-3 and MŠMT 206017-01.*

#### REFERENCES

1. Farghali H., Kameníková L., Hynie S.: *Physiol. Res.* 43, 121 (1994).
2. Farghali H., Martínek J., Mašek K.: *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 21, 395 (1999).
3. Yoon J. H., Lee H. S., Kim T. H., Woo G. H., Kim C. Y.: *FEBS Lett.*, in press.

### 32 MECHANISMUS FOTOCYTOTOXICKÝCH ÚČINKŮ INDUKOVANÉHO PROTOPORFYRINU IX NA LEUKEMICKÉ BUŇKY

DANA GREBEŇOVÁ, JITKA BARTOŠOVÁ,  
HANA CAJTHAMLOVÁ, IURI MARINOV  
a ZBYNĚK HRKAL

*Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2*

Fotodynamická terapie (PDT) je protinádorovou terapií založenou na navození zástavy buněčného cyklu, apoptózy či nekrózy maligních buněk, účinkem světlem aktivovaných fotosensibilizátorů. Přenosem energie z excitovaného fotosensibilizátoru na molekuly kyslíku dojde ke vzniku vysoce reaktivních molekul tzv. singletového kyslíku ( $^1O_2$ ). Molekuly kyslíku v singletovém stavu kriticky poškodí oxidativními procesy některé buněčné složky v jejich bezprostředním okolí (proteiny, lipidy, DNA), což následně vede k buněčné smrti. V důsledku vyššího zadržení fotosensibilizátoru nádorovou tkání ve srovnání s tkání normální dojde ke specifickému zničení maligních buněk.

V posledním desetiletí byl ve fotodynamické terapii uplatněn nový princip: namísto exogenního fotosensibilizátoru je podán prekurzor fotosensitivní látky, kyselina 5-aminolevulinová (ALA). Tímto zásahem je v buňkách překlenut první regulační krok biosyntézy hemu, syntéza ALA z glycinu a sukcinyl CoA, kontrolovaný ALA-synthasou. Prostřednictvím enzymového systému biosyntézy hemu jsou následně syntetizována v mitochondriích významná množství látky s vynikajícími fotosensibilizačními vlastnostmi, protoporphyrinu IX (PPIX). V normálních buňkách je nadbytečné množství PPIX transformováno ferochelataseou na fotodynamicky neaktivní hem, jenž je rychle degradován hemoxygenasou. Naproti tomu v nádorových buňkách se PPIX hromadí, patrně v důsledku defektní metabolické dráhy syntézy hemu (zvýšená aktivita deaminasy porfobilinogenu, snížená aktivita ferochelatasy). Následně ozáření tkáně viditelným světlem v oblasti některého z absorpčních pásů PPIX (na př. Soretova pásu) vede ke specifické destrukci maligních buněk, přičemž okolní zdravá tkáň zůstává nedotčena.

V předchozích pracích<sup>1,2</sup> jsme prokázali vysokou citlivost buněk řady leukemických linií (HL60, ML2, JURKAT, DAUDI, HEL) i krevních buněk pacientů trpících leukemickými onemocněními, k této variantě fotodynamické terapie založené na aplikaci ALA (ALA-PDT). V tomto sdělení se zabýváme mechanismem cytotoxického účinku ALA-PDT na leukemické buňky.

Faktorem, který zásadním způsobem ovlivňuje účinnost ALA-PDT je množství pohlcené světelné energie, jež je úměrné velikosti podané světelné dávky. Metodami průtokové cytometrie jsme pomocí propidium jodidu stanovili křivky přežití buněk leukemických linií po indukci ALA (1 mol.l<sup>-1</sup>, 4 h) v závislosti na světelné dávce (0–18 J.cm<sup>-2</sup>) a době kultivace (0–72 h). Množství viabilních buněk klesalo úměrně podané světelné dávce. Světelná dávka 9 J.cm<sup>-2</sup> byla minimální nutná k docílení trvalého poškození buněk (pokles viabilních buněk o více než 99 %). Při nižších hodnotách světelné dávky některé buňky přežily ALA-PDT či se zotavily z cytotoxického stresu a začaly opět proliferovat. Světelná dávka

18 J.cm<sup>-2</sup> (60 min ozařování) byla dostačující k docílení maximálního cytotoxického účinku ALA-PDT. Dále jsme pomocí fluorescenční sondy DiOC<sub>6</sub> (3,3'-dihexyloxycarbocynain jodid) sledovali pomocí průtokové cytometrie časový průběh ztráty potenciálu vnitřní mitochondriální membrány,  $\Delta\psi_m$ , jež je počátečním stadiem programované buněčné smrti, apoptózy, iniciované perturbací mitochondriálních funkcí. K poklesu potenciálu  $\Delta\psi_m$  docházelo u leukemických buněk HL60 již v průběhu ozařování, přičemž světelná dávka 18 J.cm<sup>-2</sup> vyvolala jeho zrušení u 90 % buněk.

Dalším apoptotickým parametrem, který jsme sledovali kvantitativně byla fragmentace DNA účinkem ALA-PDT, pomocí metody TUNEL založené na značení nově vznikajících 3'OH konců bromodeoxyuridem (BrdU). Maximální úroveň internukleosomální DNA fragmentace buněk HL60 (75 %) bylo dosaženo již 45 min po indukci ALA (1 mol.l<sup>-1</sup>, 4 h) a ozáření dávkou 18 J.cm<sup>-2</sup>. Dále jsme SDS elektroforézou a Western blottingem, užitím specifické anti-PARP protilátky, prokázali štěpení polymerasy poly-ADP ribosy, jež je projevem exekuční fáze apoptózy. Ke štěpení PARP docházelo již za 30 min po ALA-PDT.

Výsledky podporují představu o iniciaci apoptózy oxidativním stresem vyvolaným v mitochondriích fotoaktivací PPIX syntetizovaného v této organelle po indukci ALA, po níž následuje exekuční fáze apoptózy mající za následek štěpení reparativního proteinu PARP a DNA fragmentaci.

*Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NC/5883-3.*

#### LITERATURA

1. Grebeňová D., Cajthamlová H., Bartošová J., Marinov I., Klamová H., Fuchs O., Hrkal Z.: J. Photochem. Photobiol., B 47, 74 (1998).
2. Hrkal Z., Cajthamlová H., Grebeňová D., Bartošová J., Klamová H., Marinov I.: Cas. Lek. Cesk. 139, 147 (2000).

### 33 AKTIVITA K<sup>+</sup>-p-NITROFENYLFOSFATÁZY (K<sup>+</sup>pNPPÁZA) V TKANIVÉ CNS

MARTA BRECHTLOVÁ, MONIKA KOZINKOVÁ  
a BRANISLAV LÍŠKA

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská republika*

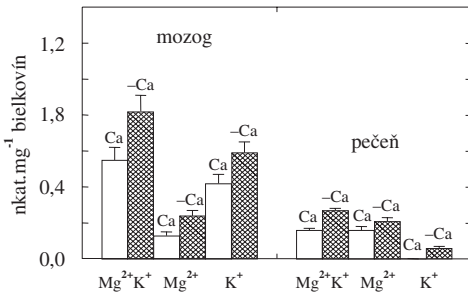
Vzhľadom na jednu z funkcií nervového systému (prenos nervového vzruchu) patrí aktivita ATP-áz, podieľajúcich sa na udržiavaní nerovnomernej distribúcie iónov, k dôležitým enzýmom tohto tkaniva. Predpokladá sa, že súčasťou aktivity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPázy je aktivita K<sup>+</sup>pNPPázy, ktorá zabezpečuje K<sup>+</sup> závislú hydrolyzu fosfoenzýmu<sup>1,2</sup>. V literatúre nie je jednoznačne vyriešený problém, či rozličné aktivity pNPPáz v závislosti od prítomnosti regulačných iónov sú prejavom existencie viacerých typov enzýmov<sup>3</sup>. V práci sú charakterizované aktivity pNPPáz v homogenátoch mozgu a pečene potkana.

Aktivity pNPPáz boli stanovené metódou podľa Stefanovica a spol. (cit.<sup>4</sup>) v 1 % homogenátoch mozgu a pečene potkana v Tris-HCl (pH 7,5) pri 37 °C v kombinácii iónov: Mg<sup>2+</sup> (3 mmol.l<sup>-1</sup>)

Tabuľka I

Vplyv vyviazania endogénneho  $\text{Ca}^{2+}$  na aktivity pNPPáz

pNPPázy	MgK(Ca)	MgK(-Ca)	Mg(Ca)	Mg(-Ca)	K(Ca)	K(-Ca)
nkat.mg <sup>-1</sup> bielkovín	0,55±0,07	0,83±0,09*	0,13±0,02	0,24±0,03*	0,42±0,05	0,59±0,06*



Obr. 1. Aktivity pNPPáz v 1 % homogenátoch mozgu a pečene potkana

a  $\text{Mg}^{2+}$  (3 mmol.l<sup>-1</sup>) +  $\text{K}^+$  (10 mmol.l<sup>-1</sup>), v prítomnosti endogénneho  $\text{Ca}^{2+}$  a po jeho vyviazaní s 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> EGTA. Uvoľnený *p*-nitrofenol bol stanovený pri 405 nm. Štatistické hodnotenie bolo robené Studentovým *t*-testom.

V homogenátoch tkanív boli stanovené aktivity pNPPáz v prítomnosti iónov  $\text{Mg}^{2+} + \text{K}^+$  a v prítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$ . Z ich rozdielu bola vypočítaná  $\text{K}^+$  aktivovaná časť pNPPázy. Vyviazanie endogénneho  $\text{Ca}^{2+}$  pochádzajúceho z homogenátu pomocou EGTA viedlo ku zvýšeniu aktivít  $\text{Mg}^{2+}$  aj  $\text{Mg}^{2+}\text{K}^+$  pNPPázy v homogenátoch mozgu (tab. I) aj kôry mozgu potkana<sup>5</sup>.

Vápnik pridávaný pri inkubácii homogenátov kôry mozgu ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>  $\text{CaCl}_2$ ) neovplyvňoval aktivitu pNPPáz (cit.<sup>5</sup>). Vyviazanie  $\text{Ca}^{2+}$  teda aktivuje jednotlivé pNPPázy, čo poukazuje na to, že množstvo vápnika nachádzajúce sa v 1 % homogenáte postačuje na inhibíciu pNPPáz, ako aj na možný zásah  $\text{Ca}^{2+}$  do regulácie ich aktivít. Porovnanie aktivít pNPPáz v homogenátoch mozgu a pečene potkana v prítomnosti endogénneho  $\text{Ca}^{2+}$  a po jeho vyviazaní ukázalo, že aktivita celkovej –  $\text{Mg}^{2+}\text{K}^+$  pNPPázy (s  $\text{Ca}^{2+}$  aj bez  $\text{Ca}^{2+}$ ) je v mozgu 3-krát vyššia ako v pečeni.

Z rovnakej aktivity  $\text{Mg}^{2+}$  pNPPázy v mozgu a pečeni a vysokej aktivácie pNPPázy pridaním  $\text{K}^+$  v mozgu, bez tejto aktivácie v pečeni, možno predpokladať, že sa jedná o dva rozličné typy enzýmov –  $\text{Mg}^{2+}$  pNPPázu a  $\text{K}^+$  pNPPázu. Na význam  $\text{K}^+$  pNPPázy v mozgu poukazuje jej vysoká aktivita v tkanive CNS, lokalizácia v synaptozómoch<sup>1</sup> a regulácia jej aktivity iónmi  $\text{Ca}^{2+}$ , kým časť aktivity regulovaná  $\text{Ca}^{2+}$  je v pečeni veľmi nízka (obr. 1). Tieto výsledky môžu poukazovať na to, že v CNS okrem  $\text{K}^+$  pNPPázy ako súčasti  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPázy by mohla existovať ďalšia  $\text{K}^+$  pNPPáza. Ak by sa aj táto aktivita zúčastňovala defosforylácie proteínov, mohla by mať vzťah k regulácii procesov v synaptozómoch súvisiacich s  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentnou fosforyláciou a následnou defosforyláciou bielkovín vezikul synaptozómov. Takto by sa jedna časť  $\text{K}^+$  pNPPázy synaptozómov podieľala na defosforylácií  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPázy a druhá aktivita (modulovaná  $\text{Ca}^{2+}$ ) na defosforylácií synapsínu, dôležitého v procese fixácie resp. uvoľňovania vezikul v neurónoch.

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu MŠ SR č. 1/6145/99.*

## LITERATÚRA

1. Guerra Marichal M., Rodriguez Del Castillo A., Martin Vasallo P., Battaner Arias E.: *Neurochem. Res.* 18, 751 (1993).
2. Robinson J. D., Robinson L. J., Martin N. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 772, 295 (1984).
3. Abdel-Latif A. A., v: *Methods of Neurochemistry* 5, str.147, (1973)
4. Stefanovic V., Ebel A., Hermet J. C., Mandel P.: *J. Neurochem.* 23, 895 (1974).
5. Líška B., Pecháň I., Turský T., Brechtlová M., Halčák L., Rendeková V., Barančík M. a spol.: *Folia Facultatis Medicae* 28, 117 (1990).



## 01 STEROL ESTERIFICATION IN YEAST – TWO ENZYMES FOR A NON-ESSENTIAL PROCESS

MARTIN VALACHOVIČ and IVAN HAPALA

*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

Sterols may exist in two forms in eukaryotic cells: as free sterols in cellular membranes and as fatty acid esters located almost exclusively in lipid particles in the cytoplasm. The pools of free and esterified sterols are freely interconvertible in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and their relative sizes depend on physiological status of the culture. The exact function of sterol esters is still a matter of discussion. Their accumulation in the stationary phase and rapid conversion to free sterols during renewal of growth<sup>1</sup> indicates a possible role of storage form sterols. Alternatively, esterification and storage in lipid particles could be involved in sequestration of sterols less optimal for membrane functions. In the yeast *S. cerevisiae*, sterol esterification is catalysed by two homologous acyl-CoA:sterol acyltransferases, Are1p and Are2p. Their individual roles in sterol turnover is not well understood, however, they appear to be not essential for yeast as single and double disruptants in genes *ARE1* and *ARE2* show normal growth pattern.

We have analysed the levels of steryl esters in mutants with inactivated *ARE1* and *ARE2* genes with the aim to get insight about their function/activity under different growth conditions. It has been reported previously that *ARE2* gene encodes the major acyl-CoA:sterol acyltransferase activity<sup>2</sup>. This fact was confirmed in our experiments in aerobic cells labelled with <sup>14</sup>C-acetate or <sup>14</sup>C-oleate when inactivation of the *ARE1* gene showed no major effect on the levels of steryl esters while inactivation of *ARE2* gene reduced the levels of steryl esters by about 60 %. This difference was preserved in cells harvested in exponential phase as well as in the early stationary phase indicating that *ARE1* and *ARE2* genes are not differentially controlled by growth phase. A different pattern of sterol esterification activity was observed in cells grown under strict anaerobiosis. Interestingly, the relative activity of Are1p and Are2p was reversed in anaerobiosis which indicated that *ARE1* gene (encoding the minor activity in aerobic cells) may be the hypoxic esterification enzyme in *S. cerevisiae*. Our results do not allow to distinguish if observed differences under various growth conditions are caused by differential expression of *ARE* genes or changes in the activities of corresponding proteins due to different availability of substrates. Anaerobic cells showed in general very low levels of steryl esters compared to aerobic cells. When the activity of Are1p and Are2p was tested in anaerobic cells incubated with various sterols as substrates, both enzymes showed a similar affinity in the order cholesterol > sitosterol > stigmasterol > ergosterol > lanosterol.

The possibility that sterol esterification is involved in removal of improper sterols from membranes<sup>3</sup> was tested in mutants with single and double disruptions of *ARE* genes with ergosterol synthesis partially inhibited by antimycotics. Inactivation of both isoenzymes in double disruptant *are1 are2* resulted in slightly increased sensitivity to low doses of itraconazole. However, the effect of Are1p and Are2p on the esterification of detrimental ergosterol precursors must be

estimated by direct analysis of pattern of esterified sterols in antimycotic-treated cells.

*This work was supported by the grant VEGA 2/5046/98.*

## REFERENCES

1. Bailey R. B., Parks L. W.: *J. Bacteriol.* 124, 606 (1975).
2. Yang H., Bard M., Bruner D. A., Gleeson A., Deckelbaum R. J., Aljinovic G., Pohl T. M., Rothstein R., Sturley S. L.: *Science* 272, 135 (1996).
3. Zweytick D., Leitner E., Kohlwein S. D., Yu Ch., Rothblatt J., Daum G.: *Eur. J. Biochem.* 267, 1075 (2000).

## 02 THE ROLE OF CYTOCHROME c OXIDASE IN REGULATION OF ENERGY METABOLISM

ZDENĚK DRAHOTA<sup>a</sup>, SUBIR ROY CHOWDHURY<sup>a,b</sup>, and JOSEF HOUŠTĚK<sup>a,b</sup>

*<sup>a</sup>Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, <sup>b</sup>Department of Paediatrics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Ke Karlovu 2, 120 00 Prague, Czech Republic*

Cytochrome c oxidase is a terminal enzyme of mitochondrial respiratory chain formed by 13 different polypeptide subunits. Some of these subunits have regulatory functions, which can modulate the enzyme activity<sup>1</sup>. The most important regulatory mechanisms are allosteric inhibition by ATP (Ref.<sup>2</sup>), fatty acid controlled proton translocation<sup>3</sup> and the role of cytochrome c oxidase as an oxygen sensor<sup>4</sup>.

Cytochrome c oxidase activity is also dependent on the integrity of the mitochondrial membrane. Solubilisation of the membrane with detergent highly increases the enzyme activity, which indicates that the cytochrome c oxidase in intact cells is down regulated. As demonstrated by several groups<sup>5-7</sup> a significant excess of cytochrome c oxidase capacity over capacities of respiratory chain linked dehydrogenases can be detected in mitochondria of most tissues. This difference can be calculated from e.g. titration of cytochrome c oxidase and succinate oxidase by KCN and results in a nonlinear dependence between inhibition of cytochrome c oxidase and inhibition of respiratory chain activity which is apparent as a "threshold behaviour". Recently however, Villani and Attardi<sup>8</sup> indicated that this situation can be different in intact cell preparations.

Using high resolution polarography (OROBOROS oxygenograph, Austria) we studied cytochrome c oxidase activity in isolated mitochondria from various tissues (heart, liver, brown fat) and in isolated (hepatocytes, cardiocytes) and cultured cells (fibroblasts, amniocytes). We found that there are pronounced differences between various tissues and cell preparations in the extent of detergent activation of cytochrome c oxidase activity. Also the values of "excess" of cytochrome c oxidase activity differ in various cell preparations tested, being maximal in cardiocytes and minimal in amniocytes.

These new aspects of understanding the mitochondrial function threshold values are very important, especially with respect of studies of mitochondrial cytopathies, because they

could help to explain why mitochondrial defects can be tissue specific even if a nuclear mutation, or homoplasmic mtDNA mutation is present.

*This work was supported by the grant of Charles University No. 70-99 and by the Grant of the Czech Grant Agency No. 303001658.*

#### REFERENCES

1. Kadenbach B., Kuhn-Nentwig L., Buge U.: *Curr. Top. Bioenergetics* 15, 113 (1987).
2. Arnold S., Kadenbach B.: *Eur. J. Biochem.* 249, 350 (1997).
3. Sharpe M., Perin I., Nicholls P.: *FEBS Lett.* 380, 134 (1996).
4. Chandel S. N., Budinger G. R. S., Choe S. H., Schumacker P. T.: *J. Biol. Chem.* 272, 1808 (1997).
5. Gellerich F. N., Kunz W. S., Bohnensack R.: *FEBS Lett.* 274, 167 (1990).
6. Villani G., Attardi G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1166 (1997).
7. Rosignol R., Malgat M., Mazat J.-P., Lettelier T.: *J. Biol. Chem.* 274, 33426 (1999).

### 03 MITOCHONDRIAL RESPIRATORY ENZYME ACTIVITIES IN HUMAN FOETAL CELLS

SUBIR ROY CHOWDHURY<sup>a,b</sup>, ZDENĚK DRAHOTA<sup>a</sup>, and JOSEF HOUŠTĚK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague,* <sup>b</sup>*Department of Paediatrics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Ke Karlovu 2, 120 00 Prague, Czech Republic*

Amniocytes represent a population of foetal cells that can be used for prenatal diagnosis of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects<sup>1-3</sup>. For systematic analysis of OXPHOS defects in foetal cells, however, limitations of various methods used for evaluation of mitochondrial functions must be considered<sup>4</sup>. We present a complex protocol for determination of the function of mitochondrial OXPHOS enzymes in cultured amniocytes using three independent and complementary methods: *i*) spectrophotometry as a technique for determination of mitochondrial enzyme activities measured under optimum conditions for particular enzyme, which refers to maximum enzyme capacity, *ii*) high resolution polarographic oxymetry as a technique to assess respiratory chain enzyme activities under *in situ* conditions in “cell-integrated OXPHOS enzyme system”, and *iii*) TMRM cytofluorometry as a technique to determine the function and efficiency of the OXPHOS system at the level of mitochondrial membrane potential. Furthermore, our studies thus represent the base for detailed prenatal analysis of OXPHOS system in mitochondrial diseases. Our data showed a modified stoichiometry between cytochrome c oxidase and complex I or II when their activities are measured under optimum or *in situ* conditions. These differences are due to detergent activation of the cytochrome c oxidase and indicate that under *in situ* conditions cytochrom c oxidase is down regulated<sup>5</sup>. Therefore, some de-

fects in Complex IV could be undetected when the enzyme activity is measured only in the presence of detergents (Table I).

Table I

Ratio of cytochrome c oxidase and succinate oxidase activity in digitonin permeabilized amniocytes

	Activity	Ratio (A/B)
Spectrophotometric determination (nmol/min/mg protein)		
Cytochrome c oxidase (A)	45.6±13.3	4.75
Succinate cytochrome c reductase (B)	9.6±2.1	
Polarographic determination (pmol oxygen/s/mg protein)		
Cytochrome c oxidase (ascorbate, TMPD, ADP)	82.5±25.7	1.13
Succinate oxidase (succinate, ADP)	72.4±22.0	

*This work was supported by the grant of Charles University, No. 70/99.*

#### REFERENCES

1. Ruitenbeek W., Wendel U., Hamel B. C., Trijbels J. M.: *J. Inherit. Metabol. Dis.* 19, 133 (1996).
2. Houštěk J., Klement P., Heřmanská J., Antonická H., Houštková H., Stratilová L., Wanders R. J. A., Zeman J.: *Prenat. Diagn.* 19, 552 (1999).
3. Wanders R. J. A., Wijburg F. A., Ruiter J., Trijbels J. M. F., Ruitenbeek W., Sengers R. C. A., Bakkeren J. A. A. M., Feller N.: *J. Inherit. Metabol. Dis.* 15, 84 (1992).
4. Villani G., Attardi G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1166 (1997).
5. Stieglerová A., Chowdhury S. R., Drahota Z., Rauchová H., Ošťádal B., Houštěk J.: *Physiol. Res.* 48, 123 (1999).

### 04 GENETIC DEFECTS OF HUMAN MITOCHONDRIAL ATP SYNTHASE

JOSEF HOUŠTĚK<sup>a</sup>, PETR KLEMENT<sup>a</sup>, DANIEL FLORYK<sup>a</sup>, HANA ANTONICKÁ<sup>a</sup>, JANA HEŘMANSKÁ<sup>a</sup>, MARTIN KALOUS<sup>a</sup>, HANA HANSÍKOVÁ<sup>b</sup>, HANA HOUŠTKOVÁ<sup>b</sup>, SUBIR CHOWDHURY<sup>a</sup>, STANISLAV KMOCH<sup>b</sup>, LEONA STRATILOVÁ<sup>b</sup>, and JIŘÍ ZEMAN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague,* <sup>b</sup>*Department of Pediatrics and Institute for Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University, 120 00 Prague, Czech Republic*

Disorders in oxidative phosphorylation (OXPHOS) enzymes represent large group of severe metabolic diseases – mitochondrial encephalomyopathies, which often manifest in

early childhood and predominantly affect muscle, brain and other tissues with high energetic demands<sup>1</sup>. Genetically are OXPHOS disorders rather complicated as the pathogenic mutations can reside in mtDNA, as well as in nuclear genes. So far described inborn defects of mitochondrial ATPase, the key enzyme of ATP production in mammalian cells are mostly caused by maternally inherited mtDNA point mutations in subunit a which disturb the function of the ATPase F<sub>0</sub> proton channel resulting in a decrease of mitochondrial ATP production<sup>2-4</sup>. Besides that, also some of the mtDNA deletions, which include ATPase genes, may result in defects of ATPase. Typical for the diseases is transmission of the mutation from an asymptomatic mother harbouring <60 % of mutated mtDNA to all children, resulting in dramatic positive segregation of the mutation.

We have found a new type of fatal mitochondrial disorder that is caused by selective deficiency of mitochondrial ATPase. The defect manifested in hypotrophic newborn by severe lactic acidosis, cardiomegaly and hepatomegaly followed by heart failure after 2 days. The activity of oligomycin-sensitive ATPase was only 31–34 % of the control, both in muscle and heart, but activities of cytochrome c oxidase, citrate synthase and pyruvate dehydrogenase were normal. The electrophoretic and Western-blot analysis revealed selective reduction of ATPase complex but normal content of the respiratory chain complexes I, III and IV. The same selective deficiency of ATPase was found in cultured skin fibroblasts which showed similar decrease in the ATPase content, ATPase hydrolytic activity and activity of substrate-dependent ATP synthesis (20–25 %, 18 % and 29–33 % of the control, respectively).

Pulse-chase labelling of patient fibroblasts revealed low incorporation of [<sup>35</sup>S]methionine into assembled ATPase complex, but increased incorporation into immunoprecipitated ATPase subunit beta, which showed very short half-life. In contrast, no difference was found in the size and subunit composition of the assembled and newly produced ATPase complex. No mutations could be found in mtDNA genes for subunit a and A6L and Northern blot analysis showed normal mRNA levels for ATPase subunits beta and c in the patient. Transmembrane cybrids prepared from enucleated fibroblasts of the patient and rho0 cells derived from 143B.TK-human osteosarcoma cells restored fully the ATPase activity, ATP synthesis and ATPase content, when compared with control cybrids. Likewise, the pattern of [<sup>35</sup>S]methionine labelling of ATPase was found to be normal in patient cybrids.

We conclude<sup>5</sup> that the described generalised deficiency of mitochondrial ATPase is thus the first human ATPase defect of nuclear origin and it is caused by an altered biosynthesis of the enzyme, probably at the level of enzyme assembly.

*Supported by grants GACR (303/97/0554, 302/99/0648) and IGA MZD CR (4035-3).*

## REFERENCES

- Wallace D. C.: *Annu. Rev. Biochem.* 61, 1175 (1992).
- Tatuch Y., Robinson B. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 124 (1993).
- Tatuch Y., Pagon R. A., Vlcek B., Roberts R., Korson M., Robinson B. H.: *Eur. J. Hum. Genet.* 2, 35 (1994).
- Houstek J., Klement P., Hermanska J., Houstkova H., Hansikova H., van den Bogert C., Zeman J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 349 (1995).
- Houstek J., et al: *Hum. Mol. Genet.* 8, 1967 (1999).

## 05 mRNA BINDING PROTEINS SPECIFIC FOR MITOCHONDRIAL ATP SYNTHASE $\beta$ -SUBUNIT

HANA ANTONICKÁ<sup>a</sup>, TATJANA KRAMAROVA<sup>b</sup>, ULF ANDERSSON<sup>b</sup>, BARBARA CANNON<sup>b</sup>, and JOSEF HOUSTEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Department of Bioenergetics, Institute of Physiology ASCR, 142 20 Prague, Czech Republic,* <sup>b</sup>*Department of Physiology, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, S-106 91 Stockholm*

Mitochondrial ATPase is the central enzyme in energy conversion of the cell. The biosynthesis of ATPase involves a complicated apparatus of genes and proteins, which have to act in concert to provide the cell with sufficient amount of fully functional enzyme. Several regulatory levels have been suggested to be involved in the biogenesis of ATPase. In ATPase-poor brown adipose tissue (BAT), which has 10-fold decreased ATPase content, only the mRNA for subunit c is decreased while the mRNA levels for all other ATPase subunits remain high<sup>1,2</sup>. Translational inhibition of ATP synthase  $\beta$ -subunit ( $\beta$ -ATPase) mRNA in prenatal rat liver has been implicated to be controlled by a protein termed 3'- $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase binding protein<sup>3</sup>. The studies on mRNA of  $\beta$ -ATPase subunit showed that overexpressed mRNAs of ATPase subunits seem to have decreased half-life and low translational efficacy in BAT compared with other tissues<sup>4</sup>.

We have identified two mammalian cytosolic proteins, BARB1 and BARB2, that selectively interact with the 3'-untranslated region of  $\beta$ -ATPase mRNA, and their role in post-transcriptional regulation of  $\beta$ -ATPase mRNA was proposed<sup>5</sup>. To determine the binding requirements for BARB1 and BARB2, series of different RNA probes, spanning the coding region and the 3'-UTR, were used in electromobility shift assay (EMSA) and cross-link experiments. BARB1 and BARB2 interaction with  $\beta$ -ATPase mRNA were further characterised by means of the displacement of RNA-protein binding by homoribopolymers and unlabelled specific and unspecific riboprobes, competition assays with oligonucleotides complementary to the putative binding regions and RNA probes carrying deletions of these regions.

The results indicate that BARB1 binding involves interaction with the actual poly(A) tail but also requires specific upstream element; BARB2 can bind without BARB1, however BARB1 is a *bona fide* poly(A) binding protein with specificity for  $\beta$ -ATPase mRNA and BARB2 binds  $\beta$ -ATPase mRNA via U-rich region, and the binding involves different or several poly(U) sites. We suggest that BARB2 recognises two or more distinct regions in the  $\beta$ -ATPase mRNA, and the binding is relatively unspecific with respect to different U-rich sequence motif.

In order to characterise the BARB proteins, FPLC chromatography, Northwestern analysis, electrophoretic separations and MALDI-TOF analysis were performed. The  $\beta$ -ATPase mRNA binding proteins were identified as heat-shock cognate protein 70 (Hsc70) and heat-shock protein 84 (Hsp84).

In conclusion, post-transcriptional regulation of  $\beta$ -ATPase reveals a novel principle for conferring selectivity of poly(A) binding protein. It could be suggested that analogous specific post-transcriptional control exists also for other mitochondrial proteins, where gene expression does not correlate with the amount of the corresponding protein products.

*This work was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic (303/97/0554) and the Grant Agency of Charles University (6-239/97).*

#### REFERENCES

1. Houštěk J., Andersson U., Tvrdík P., Nedergaard J., Cannon B.: *J. Biol. Chem.* 270, 7689 (1995).
2. Andersson U., Houštěk J., Cannon B.: *Biochem. J.* 323, 379 (1997).
3. Izquierdo J. M., Cuezva J. M.: *Mol. Cell. Biol.* 17, 5255 (1997).
4. Tvrdík P., Kužela S., Houštěk J.: *FEBS Lett.* 313, 23 (1992).
5. Andersson U., Antonicka H., Houstek J., Cannon B.: *J. Biochem.* 346, 33 (2000).

#### 06 ROZPŘAŽENÍ MITOCHONDRIÁLNÍ OXIDAČNÍ FOSFORYLACE V ADIPOCYTECH BÍLÉ TUKOVÉ TKÁNĚ INHIBUJE SYNTÉZU MASTNÝCH KYSELIN

JAN KOPECKÝ, MARTIN ROSSMEISL,  
IVO SYROVÝ, FILIP BAUMRUK, PAVEL FLACHS  
a PETRA JANOVSKÁ

*Oddělení biologie tukové tkáně, FgÚ AV ČR, Vídeňská 1083,  
142 20 Praha*

Syntéza mastných kyselin (MK) *de novo* v adipocytech je důležitá pro řízení celkového množství tělesného tuku. U člověka může lipogeneze v tukové tkáni představovat až 40 % veškeré syntézy MK. Pro syntézu MK v tukové tkáni je nezbytná kooperace enzymů v cytoplazmě a v mitochondriích. Mitochondrie jsou pro lipogenezu nezbytné díky syntéze ATP a proto, že napomáhají tvorbě acetyl koenzymu A a NADPH v cytoplazmě. Protože hladiny všech výše uvedených metabolitů závisí na účinnosti energetické přeměny v mitochondriích, „rozpřažení“ oxidační fosforylace by mohlo snižovat rychlost syntézy MK. Již Rognstad a Katz<sup>1</sup> prokázali inhibici syntézy MK ve fragmentech tukové tkáně inkubovaných s 2,4-dinitrofenolem (DNP). Snažili jsme se ověřit, zda syntézu MK v tukové tkáni mohou ovlivňovat mitochondriální rozpřahující proteiny (UCP). Existuje několik příbuzných UCP, a všechny pravděpodobně zvyšují propustnost vnitřní mitochondriální membrány pro protony. UCP1 je přítomen pouze v hnědém tuku a je nezbytný pro tvorbu tepla v této tkáni. V bílé tukové tkáni je silně exprimován gen UCP2 a předpokládá se, že UCP2 má vztah k regulaci tělesné hmotnosti a obezité.

Pokusy byly prováděny na adipocytech buněčné linie 3T3-L1 diferencovaných *in vitro*, a na transgenních myších, rezistentních vůči obezitě díky indukci UCP1 v bílé tukové tkáni<sup>2</sup>. Syntéza a oxidace MK v adipocytech a tukové tkáni byly měřeny pomocí radioaktivních substrátů, membránový poten-

ciál mitochondrií v adipocytech pomocí fluorescenční sondy TMRM a průtokové cytometrie, genová exprese pomocí semikvantitativní RT-PCR.

DNP snižoval čtyřnásobně syntézu MK v 3T3-L1 adipocytech *in vitro*, zatímco oxidace MK byla stimulována o 50 %. Inhibice syntézy korelovala se snižováním mitochondriálního membránového potenciálu. Také transgenní UCP1 v tukové tkáni transgenních myší snižoval syntézu MK až čtyřnásobně, v korelaci s expresí transgenu a efektem transgenu na množství tuku. Hladiny transkriptů pro lipogenní enzymy byly nižší v tukové tkáni transgenních myší než u kontrol.

Prokázali jsme, že rozpřažení oxidační fosforylace v tukové tkáni vlivem UCP snižuje syntézu MK (cit.<sup>3</sup>). To by mohlo být hlavní funkcí UCP2 v bílé tukové tkáni.

#### LITERATURA

1. Rognstad R., Katz J.: *Biochem. J.* 111, 431 (1969).
2. Kopecký J., Clarke G., Enerbäck S., Spiegelman B., Kozak L. P.: *J. Clin. Invest.* 96, 2914 (1995).
3. Rossmeisl M., Syrový I., Baumruk F., Flachs P., Janovská P., Kopecký J.: *FASEB J.*, v tisku.

#### 07 ROZPŘAŽENÍ MITOCHONDRIÍ V ADIPOCYTECH BÍLÉ TUKOVÉ TKÁNĚ SNIŽUJE EXPRESI GENŮ PRO PPAR $\gamma$ A aP2

PAVEL FLACHS, MARTIN ROSSMEISL,  
FILIP BAUMRUK, PETRA JANOVSKÁ  
a JAN KOPECKÝ

*Oddělení biologie tukové tkáně, FgÚ AV ČR, Vídeňská 1083,  
142 20 Praha*

Účinnost mitochondriální oxidační fosforylace v adipocytech bílé tukové tkáně může ovlivňovat celkové množství tuku v těle. Ektopická syntéza rozpřahujícího proteinu 1 (UCP1) v bílé tukové tkáni transgenních (aP2-*Ucp1*) myší ovlivňuje rozložení tělesného tuku a chrání proti obezitě<sup>1</sup>. Hyperleptinémie vyvolaná v potkaních adenovirovým přenosem genu pro leptin (tkáňový hormon produkovaný tukovou tkání) snižuje obsah tuku tím, že indukuje expresi rozpřahujících proteinů UCP1 a UCP2, zvyšuje oxidaci mastných kyselin a inhibuje syntézu lipogenních enzymů a jejich transkripčního faktoru PPAR $\gamma$ 2 (cit.<sup>2</sup>). V bílé tukové tkáni je gen UCP2 silně exprimován i za normálních podmínek, má vztah k regulaci tělesné hmotnosti a předpokládá se, že by mohl snižovat účinnost oxidační fosforylace. Naším cílem bylo vysvětlit proč odpřažení snižuje lipogenezu bílé tukové tkáně<sup>3</sup>.

Analýza genové exprese byla provedena pomocí metod „Northern blotingu“ a semikvantitativní RT-PCR. Byly použity transgenní (aP2-*Ucp1*) a kontrolní myši (kmen C57BL/6J) a adipocyty odvozené od těchto zvířat a diferencované *in vitro* v primárních kulturách. Mitochondriální membránový potenciál ( $\Delta\Psi_m$ ) v adipocytech byl změřen pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční sondy TMRM.

V podkožním bílém tuku transgenních myší je, v porovnání s kontrolami, 2–3× nižší hladina transkriptů genů pro „lipid binding protein“ aP2 (marker lipogeneze) a PPAR $\gamma$ 2. Exprese aP2 genu v adipocytech diferencovaných *in vitro*



negativně korelovala s expresí transgenního UCP1. Adipocyty odvozené z transgenních myší vykazují relativně nízký membránový potenciál.

Naše výsledky ukazují, že rozpražení mitochondriální oxidační fosforylace v adipocytech bílé tukové tkáně může snižovat expresi transkripčního faktoru PPAR $\gamma$  a následně tak i expresi lipogenních enzymů.

#### LITERATURA

1. Kopecký J., Clarke G., Enerbäck S., Spiegelman B., Kozak L. P.: *J. Clin. Invest.* 96, 2914 (1995).
2. Zhou Y. T., Shimabukuro M., Koyama K., Lee Y., Wang M. Y., Trieu F., Newgard C. B., Unger R. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94.
3. Rossmesl M., Syrový I., Baumruk F., Flachs P., Janovská P., Kopecký J.: *FASEB J.*, v tisku.

#### 08 INDUKCE MITOCHONDRIÁLNÍHO ROZPRAHUJÍCÍHO PROTEINU UCP1 V BÍLÉ TUKOVÉ TKÁNI VYSOKOTUKOVOU DIETOU

TOMÁŠ PRAŽÁK, MILADA HORÁKOVÁ,  
PAVEL FLACHS, PETR BRAUNER a JAN KOPECKÝ

*Oddělení biologie tukové tkáně, FgÚ AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha*

Gen rozpražujícího proteinu 1 (UCP1) je exprimován pouze v hnědé tukové tkáni savců. Tato bílkovina vnitřní mitochondriální membrány je nezbytná pro termogenezu v hnědém tuku, uplatňuje se při udržování stálé tělesné teploty, ale také při řízení celkové energetické bilance organismu. Expresí genu UCP1 je indukována, a množství HT vzrůstá, během adaptace na chlad a při krmení zvířat „cafeteria diet“, tj. za podmínek, které vedou k vyššímu kalorickému příjmu. Vliv nadměrného kalorického příjmu na tělesnou hmotnost je proto minimální, protože většina nadbytečné metabolické energie přijaté potravou je uvolňována termogenezí v hnědém tuku. Bílá tuková tkáň u myší, ale pravděpodobně i u člověka, obsahuje prekurzory hnědotukových adipocytů. Cílem této práce bylo zjistit, zda podávání stravy s vysokým obsahem tuků vyvolá diferenciaci hnědotukových adipocytů v bílé tukové tkáni, resp. expresi genu UCP1.

Samci myší kmene C57BL/6J byly od ostavu (ve čtyřech týdnech po narození) krmeny po dva týdny vysokotukovou dietou (10, 60 a 27 % kalorií ve formě bílkoviny, tuku a sacharidů) nebo standardní laboratorní dietou ST1, Velaz (27, 25 a 38 % kalorií ve formě bílkoviny, tuku a sacharidů). Obdobný pokus byl proveden i na dospělých zvířatech (ve stáří osmi měsíců), krmených od ostavu standardní dietou a pak po dva týdny vysokotukovou dietou. V bílé tukové tkáni z podkoží a z břicha (epididymální tuk) a v interskapulární hnědé tukové tkáni byla hodnocena exprese genu UCP1 na úrovni hladin transkriptu (semikvantitativní „Real Time RT-PCR“) a na úrovni hladin UCP1-antigenů (imunoblotací) se specifickou UCP1 protilátkou. Buňky exprimující gen UCP1 v tukové tkáni byly charakterizovány imunohistochemicky.

Vysokotuková dieta indukovala expresi UCP1 v bílé tukové tkáni v podkoží u myší po ostavu i u dospělých zvířat.

Výraznější indukce byla pozorována na úrovni hladin transkriptu pro UCP1 (3 $\times$ ), než na úrovni samotné bílkoviny (1,8–2,5 $\times$ ). Imunohistochemická analýza prokázala expresi UCP1 jen v malé frakci buněk tukové tkáně. V epididymální tukové tkáni myší obou věkových skupin nebyla indukce nalezena. Také v interskapulárním hnědém tuku byl gen UCP1 indukován vysokotukovou dietou, ale pouze u myší po ostavu, a ne u dospělých zvířat.

Vysokotuková dieta indukuje expresi UCP1 a diferenciaci hnědotukových buněk v bílé tukové tkáni v podkoží, bez ohledu na věk zvířat. Tato dieta aktivuje gen UCP1 i v interskapulárním depu hnědého tuku, ale jen u myší těsně po ostavu, a ne u dospělých zvířat.

#### 09 THE ROLE OF MITOCHONDRIAL UCP2 IN CONTROL OF LIPOGENESIS IN WHITE FAT DURING FASTING

KRISTINA BARDOVÁ, RADKA MIKULOVÁ,  
PAVEL FLACHS, IVO SYROVÝ, and JAN KOPECKÝ

*Department of Adipose Tissue Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic*

Uncoupling protein 2 (UCP2) is a recently discovered component of mitochondria. Similarly to the brown fat specific UCP1, also UCP2 probably mediates proton leak across the inner mitochondrial membrane, decreases mitochondrial membrane potential, and uncouples ATP production from substrate oxidation. UCP2 has a wide tissue distribution, with the highest levels of the UCP2 transcript detected in adipocytes and myeloid cells of the immune system<sup>1</sup>. The prevailing opinion is that the function of UCP2 in white fat is linked to overall metabolic energy efficiency and obesity, as also supported by relatively low expression of UCP2 gene in abdominal white fat of morbidly obese patients<sup>2</sup>, or high expression in mice strain resistant to obesity<sup>3</sup>. It was shown that mitochondrial uncoupling induced in white fat *in vitro* by 2,4-dinitrophenol<sup>4</sup>, or in transgenic mice by ectopic UCP1 (Ref.<sup>5</sup>), resulted in the inhibition of *in situ* fatty acid synthesis. This inhibition probably resulted from the lack of mitochondrial ATP synthesis, required for the fatty acid synthesis. However, transcriptional control of the lipogenic enzymes could be also involved. The aim of this study was to verify a hypothesis whether UCP2 may function as a regulator of lipogenesis in white fat, and namely whether it may be involved in the inhibition of lipogenesis during fasting.

Obesity-resistant A/J and obesity-prone C57BL/6J mice were maintained at 20 °C with a 12 h light-dark cycle. 6 A/J mice and 6 C57BL/6J mice were used as a control, and 9 A/J mice and 6 C57BL/6J mice fasted for 24 h. Total RNA was isolated from intraperitoneal adipose tissue and analysed on Northern blots using ssDNA probes for mouse UCP2, pyruvate carboxylase, fatty acid synthase, and a probe for a consensus sequence of acetyl-CoA carboxylase. Fatty acid synthesis was measured *in vitro* according to procedure published in Ref.<sup>5</sup>

In response to 24 h fasting, the activity of fatty acid synthesis in epididymal white fat decreased by 20 and 70 %

in A/J and C57BL/6J mice, respectively. During fasting, the level of UCP2 transcript increased 2-fold in epididymal white fat of both A/J and C57BL/6J strains of mice, while the expression of the gene for acetyl-CoA carboxylase decreased by 72 and 90 %, and that of the gene for fatty acid synthase decreased by 46 and 73 % in the case of A/J and C57BL/6J mice, respectively. However, the expression of the gene for pyruvate carboxylase, the intramitochondrial enzyme presumably sensitive to intramitochondrial ATP/ADP ratio, and required for the maintenance of the overall metabolic flux through the pathway of fatty acid synthesis, did not change in response to fasting in the case of A/J mice, and decreased by 40% in the case of C57BL/6J mice.

Our results support the hypothesis that UCP2 is engaged in the control of fatty acid synthesis in white fat during fasting. However, the molecular mechanism of the link between UCP2 and lipogenesis has to be established.

## REFERENCES

1. Ricquier D., Bouillaud F.: *Biochem. J.* 345, 161 (2000).
2. Oberkofler H., Liu Y. M., Esterbauer H., Hell E., Krempfer F., Patsch W.: *Diabetologia* 41, 940 (1998).
3. Gong D. W., He Y., Reitman M. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 27 (1999).
4. Katz J., Wals P. A., Rognstad R.: *Biochim. Biophys. Acta* 337, 313 (1974).
5. Rossmeisl M., Syrový I., Baumruk F., Flachs P., Janovská P., Kopecký J.: *FASEB J.*, in press.

## 10 POKLES HEMATOPOÉZY A EXPRESE UNCOUPLING PROTEINU 2 V JÁTRECH ČLOVĚKA PO PORODU

PETR BRAUNER<sup>a</sup>, MARYSE NIBBELINK<sup>b</sup>, PAVEL FLACHS<sup>a</sup>, IVANA VÍTKOVÁ<sup>c</sup>, PAVEL KOPECKÝ<sup>d</sup>, IRENA MERTELÍKOVÁ<sup>a</sup>, LENKA JANDEROVÁ<sup>a</sup>, LUC PÉNICAUD<sup>b</sup>, LOUIS CASTEILLA<sup>b</sup>, RICHARD PĽAVKA<sup>d</sup> a JAN KOPECKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha, <sup>b</sup>UMR 5018, UPS-CNRS, Institut Louis Bugnard, Toulouse, Francie, <sup>c</sup>Patologický ústav a <sup>d</sup>Neonatologické oddělení Gynekologicko-porodnické kliniky, VFN, I. LF UK, 128 51 Praha

Játra jsou orgánem důležitým pro krvetvorbu během embryonálního a fetálního vývoje člověka. Jsou hlavním zdrojem červených krvinek počínaje 9. týdnem gestace, ve 24. týdnu přebírá tuto úlohu kostní dřev. Schopnost hematopoézy v játrech prudce klesá krátce po porodu. Zjistili jsme, že mitochondriální uncoupling protein 2 (UCP2) je markerem krvetvorných buněk ve fetálních játrech myši a potkana<sup>1</sup>. Za fyziologických podmínek je gen UCP2 exprimován pouze v makrofázích<sup>2</sup>, exprese v hepatocytech byla pozorována jen při některých patologických stavech spojených s infekcí, steatózou a tumory jater<sup>3</sup>. Podobně jako další proteiny z rodiny UCP, také UCP2 pravděpodobně řídí účinnost přeměny energie na vnitřní mitochondriální membráně. Předpokládá se, že jeho funkcí v makrofázích je snižování produkce volných kyslíkových radi-

kálů<sup>4</sup>. Cílem práce bylo charakterizovat buněčné typy exprimující gen UCP2 v játrech v perinatálním období u člověka a zjistit, jakým způsobem tato exprese koreluje s jaterní hematopoézou.

Pokusy byly prováděny na autoptických vzorcích jater 22 lidských novorozenců, kteří z různých důvodů zemřeli krátce (45 minut až 140 dní) po porodu, a jednoho fétu (umělé přerušení těhotenství ve 23. týdnu gestace z důvodu indikované dědičné choroby). Převážnou část souboru tvořili novorozenci s velmi nízkou porodní hmotností (<1000 g, gestační věk mezi 23. a 32. týdnem, 16 případů). Soubor obsahoval 6 dětí s porodní hmotností >1000 g (gestační věk >28 týdnů, z toho 2 novorozenci narození v řádném termínu). Hematopoéza byla vyhodnocována histologicky, UCP2 exprese metodami Northern blotu, Western blotu, imunohistochemie a *in situ* hybridizace.

Byl potvrzen prudký pokles počtu krvetvorných buněk v játrech po porodu, a to bez ohledu na gestační věk dítěte. Expresse UCP2 sledovala vývoj hematopoézy. UCP2 byl detekován pouze v myeloidních (zejména Kupfferových) buňkách, a ne v hepatocytech, i přes výskyt různých onemocnění doprovázených sepsí a jaterní steatózou. Naše výsledky prokázaly, že porod je urychlujícím faktorem pro pokles hematopoézy v lidských játrech bez ohledu na gestační věk. Pokles exprese genu UCP2 koreluje s poklesem hematopoézy. UCP2 má pravděpodobně důležitou úlohu pro funkci makrofágů (fagocytóza, oxidační vzplanutí) a slouží jako marker jaterní hematopoézy v perinatálním období.

Autoři děkují za finanční podporu grantům IGA MZ 4643-3, NATO LST.CLG97502 a Barrande 98082-2.

## LITERATURA

1. Hodný Z., Kolářová P., Rossmeisl M., Horáková M., Nibbelink M., Pénicaud L., Casteilla L., Kopecký J.: *FEBS Lett.* 15, 185 (1998).
2. Larrouy D., Laharrague P., Carrera G., Viguerie-Bascands N., Levi-Meyrueis C., Fleury C., Pecqueur C., Nibbelink M., André M., Casteilla L., Ricquier D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 760 (1997).
3. Cortez-Pinto H., Yang S. Q., Lin H. Z., Costa S., Hwang C. S., Lane M. D., Bagby G., Diehl A. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 313 (1998).
4. Nègre-Salvayre A., Hirtz C., Carrera G., Cazenave R., Trolly M., Salvayre R., Pénicaud L., Casteilla L.: *FASEB J.* 11, 809 (1997).

## 11 THE BIOGENESIS OF MITOCHONDRIA AS A POSSIBLE TARGET FOR CYTOTOXIC ACTION OF Bax IN YEAST CELLS

INGRID KIŠŠOVÁ, PETER POLČIC, MICHAELA VACHOVÁ, and JORDAN KOLAROV

Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Comenius University, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

Apoptosis is an evolutionarily conserved cell suicide mechanism that plays a crucial role in various biological events,

including development, tissue homeostasis, and removal of unwanted cells. Apoptotic signals are activated by various stimuli and converge towards a common death pathway, for which Bcl-2 family proteins act as regulators and caspase family proteases as the signal transducers.

Recent evidences suggest that the mitochondria play a key function in apoptosis. The interaction between mitochondrial membranes and proapoptotic proteins of Bcl-2 family (Bax, Bak) leads to the opening of the mitochondrial permeability transition pore and to the release of apoptogenic factors such as cytochrome c and AIF from the intermembrane space into the cytosol<sup>1</sup>. The cytochrome c in the cytosol activates the caspases – specific proteases of cell death that then cleave the number of target substrates and thus are directly or indirectly responsible for the characteristic morphological and biochemical features of apoptotic cells<sup>2,3</sup>. These events are prevented by antiapoptotic members of Bcl-2 family of proteins<sup>4</sup>.

In *Saccharomyces cerevisiae* genome no homologues of any important regulator of metazoan apoptosis were detected, but the expression of these proteins in yeast cells induces growth defects, cytochrome c release to the cytosol<sup>5</sup> and apoptotic phenotypes characteristic for metazoan cells<sup>6</sup>. The fact that the mentioned phenotypes can be prevented by co-expression of antiapoptotic Bcl-2 proteins<sup>7</sup> indicate that in yeast cells Bax may act directly upon conserved cellular components that correspond to their apoptotic targets in mammalian cells.

In this work, we examined the effect of murine Bax expression on *i*) the growth properties, *ii*) the mitochondrial functions and *iii*) the import of proteins to the mitochondria in wild type *S. cerevisiae* cells.

Expression of murine Bax has the cytotoxic effect on yeast cells; it induces the growth arrest and death as observed by the vital fluorescent staining and plating assay.

The effect of Bax expression on the mitochondrial respiration and membrane potential ( $\Delta\psi$ ) was measured in permeabilised spheroplasts using Clark oxygen electrode and  $\Delta\psi$  sensitive fluorescence dye rhodamine 123, respectively. The respiration rate of the Bax expressing cells is ~50 % reduced as compared to the wild type yeast. The mitochondria in Bax expressing cells are capable of developing transmembrane potential with magnitude similar to that observed in the control cells. However, the addition of ADP to mitochondria in Bax expressing cells does not produce a decrease of transmembrane potential<sup>8</sup>. The effect of Bax on both the mitochondrial respiration and the properties of mitochondrial transmembrane potential indicates that the Bax interacts with the yeast mitochondrial proteins and/or lipids.

To estimate the effect of Bax on the import of proteins to the mitochondria, we have used *GFP* fusions with two mitochondrial proteins – the *MTP1* that contains a cleavable N-terminal targeting sequence and the *AAC1* that belongs to the mitochondrial carrier family of proteins possessing the internal targeting sequences and is taken up by mitochondria by the different import pathway<sup>9,10</sup>. Yeast cells were co-transformed with plasmids carrying the fusion proteins and *BAX* carrying plasmid, and analyzed for fluorescence at different times after the Bax induction. The mitochondrially localised fluorescence of the *AAC1-GFP* was after the Bax induction extinguished while the *MTP1-GFP* expressing cells retained the mitochondrial fluorescence at the corresponding times, what suggests

that Bax preferentially inhibits the import of carrier proteins to yeast mitochondria<sup>8</sup>.

We propose that Bax induced permeability of outer mitochondrial membrane should lead to the release of essential soluble components of import machinery of carrier proteins (TIM8, 9, 10, 12) and by this way may influence the import of proteins to the mitochondria.

*This work was supported by the Howard Hughes Medical Institute Grant No. 75195-547301.*

## REFERENCES

1. Green D. R., Reed J. C.: *Science* 281, 1309 (1998).
2. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X.: *Cell* 94, 481 (1998).
3. Li H., Zhu H., Xu C. J., Juan J.: *Cell* 94, 491 (1998).
4. Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng I.-I., Jones D. P., Wang X.: *Science* 275, 1129 (1997).
5. Zha H., Fisk H. A., Yaffe M., Mahajan N., Herman B., Reed J. C.: *Mol. Cell. Biol.* 16, 6494 (1996).
6. Ligr M., Madoe F., Frohlich E., Hilt W., Frohlich K.-U., Wolf D. H.: *FEBS Lett.* 438, 61 (1998).
7. Greenhalf W., Stephan C., Chaudhuri B.: *FEBS Lett.* 380, 169 (1996).
8. Kiššová I., Polčic P., Kempná P., Zeman I., Šabová L., Kolarov J.: *FEBS Lett.* 471, 113 (2000).
9. Koehler C. M., Jarosch E., Tokatlidis K., Schmid K., Schweyen R., Schatz G.: *Science* 279, 369 (1998).
10. Sirenberg C., Endres M., Folsch H., Stuart R. A., Neupert W., Brunner M.: *Science* 391, 912 (1998).

## 12 THE ATTEMPT TO MIMIC BAX INDUCED PHENOTYPES IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE BY ABROGATING MITOCHONDRIAL FUNCTIONS

PETER POLČIC, INGRID KIŠŠOVÁ,  
MARTINA BALIOVÁ, and JORDAN KOLAROV

*Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Comenius University, 842 15 Bratislava, Slovak Republic*

In mammalian cells Bax protein promotes the apoptosis by the release of apoptogenic proteins, such as cytochrome c, AIF or procaspase-9, from the mitochondrial intermembrane space to the cytosol<sup>1</sup>. The proposed mechanism by which Bax interacts with the mitochondrial membranes is the Bax induced opening of the nonspecific channel known as mitochondrial permeability transition pore (PTP). Although the channel properties of the PTP are well known, its protein composition remains unclear. The evidences suggest that the pore complex may include the voltage dependent anion channel of the outer mitochondrial membrane, ADP/ATP carrier of the inner membrane together with hexokinase, cyclophilin D and benzodiazepine receptor<sup>2</sup>.

Bax is a member of the Bcl-2 protein family – family of

proteins which include both the apoptotic agonists such as Bax, Bak, Bad, Bid and the antagonists Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>.

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not contain any homologue of Bcl-2 family nor of the caspases – the proteases involved in the metazoan apoptosis. When expressed in yeast, Bax induces cell death<sup>3</sup> as well as the cytochrome c release from mitochondria<sup>4</sup>. Since the coexpression of antiapoptotic Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub> prevents yeast cells from the death the Bax action is considered a specific and it is supposed that its cellular (mitochondrial) target is the same as in the mammalian cells. This promotes the yeast to the position of an attractive model for the studying the mechanism of action of the apoptotic regulator proteins.

In this work the role of mitochondrial ADP/ATP carrier (Aac) and components of mitochondrial respiratory chain encoded by the mitochondrial DNA has been investigated. The Bax induced change of growth characteristics and the viability of wild type yeast and the mutants with AAC genes deleted or respiratory deficient ( $\rho^0$ ) strain was examined. The mentioned yeast strains were transformed by the plasmid carrying the murine BAX gene under the control of inducible GAL10 promoter and the growth characteristics in the galactose containing media were assayed. The viability was tested by the spreading of the aliquots on the glucose containing plates and by vital fluorescent staining.

Results show that neither AAC deletion nor  $\rho^0$  mutation affects the Bax induced cell killing. In all strains tested the 2–3 generations are required for the 90 % viability decrease. The observed lag in the mutant strains is the consequence of their reduced growth rate.

Since we have shown that the essential process of mitochondrial biogenesis – the import of the proteins to the inner mitochondrial membrane – should be affected by the Bax expression<sup>5</sup>, we attempted to mimic the Bax induced phenotypes by the combination of the mutations and specific mitochondrial inhibitors that affect the mitochondrial biogenesis. The effect of antimycin A – the inhibitor of respiration, and bongkrekate – the inhibitor of ADP/ATP transport on the growth and viability of the wild type, AAC deletion and  $\rho^0$  strain was tested. The results will be discussed.

In summary, our results indicate that Bax kill the yeast cells by inhibiting the mitochondrial biogenesis. We proposed that possible mechanism should include a release to cytosol of soluble components of the mitochondrial protein import machinery (TIM9, TIM10, TIM 12, TIM8) essential for the import of mitochondrial carrier proteins.

*This work was supported by the Howard Hughes Medical Institute Grant No. 75195-547301.*

## REFERENCES

- Green D. R., Reed J. C.: *Science* 281, 1309 (1998).
- Zoratti M., Szabo I.: *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139 (1995).
- Zha H., Fisk H. A., Yaffe M., Mahajan N., Herman B., Reed J. C.: *Mol. Cell. Biol.* 16, 6494 (1996).
- Priault M., Chaudhuri B., Clow A., Camougrand N., Manon S.: *Eur. J. Biochem.* 260, 684 (1999).
- Kiššová I., Polčic P., Kempná P., Zeman I., Šabová L., Kolarov J.: *FEBS Lett.* 471, 113 (2000).

## 13 CIRCULATION OF Ca<sup>++</sup> IONS ACROSS THE PLASMA MEMBRANE OF METHANOBACTERIUM THERMOAUTOTROPHICUM IS OBLIGATORY FOR METHANOGENESIS AND GROWTH OF THESE MICROORGANISMS

PETER ŠMIGÁŇ, PETER POLÁK,  
ALAN MAJERNÍK, and MILOSLAV GREKSÁK

*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

In eukaryotic cells, variation in the level of cytosolic free calcium ions regulate processes as important as chemotaxis chromosome segregation, ion transport, mitochondrial functions (ATP synthesis included), phospholipase activity and many others. Cytosolic free calcium concentration is controlled by the action of specific transport system<sup>1</sup>.

In prokaryotes, diverse and important roles have also been attributed to calcium ions<sup>2</sup>.

From studies with different bacterial species, it has been estimated that, in analogy to eukaryotes, the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration is maintained well below the extracellular medium.

In methanoarchaea *Methanobacterium thermoautotrophicum* the presence of H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> – linked Ca<sup>2+</sup> extruding systems have been described. The results obtained are in agreement with the model in which Ca<sup>2+</sup> influx pathway is represented by a membrane potential-driven uniport whereas Ca<sup>2+</sup> efflux is mediated by two transport system – Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporters – whose participation in the total efflux is dependent on the energy of the corresponding gradients of driving ions<sup>3,4</sup>. The role of these transport systems in Ca<sup>2+</sup> ions metabolism is not understood. Recently, we have found out that the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> activity cells *M. thermoautotrophicum* is under the control of calcium ions<sup>5</sup>.

In this paper we report that the growth and methanogenesis of *M. thermoautotrophicum* is under the control of calcium ions. The growth of these cell was strongly inhibited in the medium supplemented with divalent cations chelators EDTA or EGTA respectively. The growth of these microorganisms was inhibited also in the presence of ruthenium red (strong

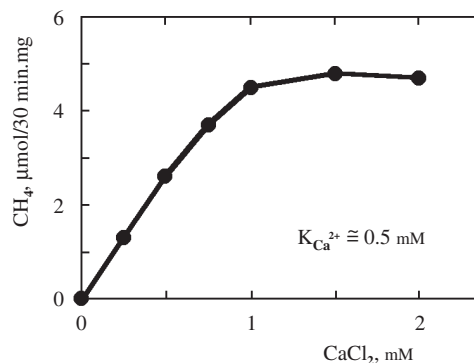


Fig. 1. Calcium dependence of methan formation in *M. thermoautotrophicum*. Cells were suspended in 50 mM-MOPS-Tris buffer (pH 7.0) to a concentration 1.5 mg protein per 1 ml. App.  $K_m$  value for calcium was calculated from a double-reciprocal plot of the rate of methanogenesis versus calcium concentrations



inhibitor of Ca<sup>2+</sup> uniport in mitochondria). On the other hand EGTA did not exert the inhibitory effect on membrane potential. Methanogenesis in *M. thermoautotrophicum* from hydrogen and carbon dioxide was found to be dependent on Ca<sup>2+</sup> ions (Fig. 1). Magnesium ions exerted similar activity. The stimulatory effect of Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> ions on methane formation was not observed. The calcium dependent methanogenesis was coupled with ATP synthesis. The methanogenesis in these cells was profoundly inhibited in the presence of divalent cations ionophore A23187.

In conclusion, the present study demonstrate that also in methanoarchaea *M. thermoautotrophicum* strain ΔH calcium ions circulation is obligatory for methanogenesis and growth.

*This work was supported by Research Grant VEGA No. 2/7134/20 from the Slovak Academy of Sciences.*

#### REFERENCES

- Campbell A. K., in: *Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator* (Chichester J., ed.), p. 56. Wiley, 1983.
- Onek L. A., Smith R. J.: *J. Gen. Microbiol.* 138, 1039 (1992).
- Varečka L., Šmigáň P., Greksák M.: *FEBS Lett.* 399, 171 (1996).
- Varečka L., Šmigáň P., Greksák M.: *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 241 (1993).
- Majerník A., Šmigáň P., Greksák M.: *Biochem. Mol. Intern.* 43, 123 (1997).

#### 14 A MUTANT STRAIN OF *METHANOBACTERIUM THERMOAUTOTROPHICUM* WITH A LESION IN Na<sup>+</sup>-TRANSLOCATING ATPase – BIOENERGETIC PARAMETERS UNDER DIFFERENT EXTERNAL CONDITIONS

PETER POLÁK, PETER ŠMIGÁŇ,  
ALAN MAJERNÍK, and MILOSLAV GREKSÁK

*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Moyzesova 61, 90028 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

In some methanogenic archaea the existence of Na<sup>+</sup>-bioenergetic cycle in addition to H<sup>+</sup>-bioenergetic cycle has been postulated<sup>1</sup>. To understand the function and interrelationship of these bioenergetic subsystems, genetic elimination of the components of the bioenergetic machinery was recently introduced. A mutant of *Methanobacterium thermoautotrophicum* with a lesion in Na<sup>+</sup>-translocating ATPase (synthase) was isolated<sup>2</sup>. In the present study the effects of different concentrations of Na<sup>+</sup> ions, of protonophore 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide (TCS) and of alkaline pH on methanogenesis, methanogenic electron transport driven ATP synthesis and membrane potential (Δψ) of this mutant strain were determined.

The methanogenesis of whole cells of the mutant strain was at pH 8.5 comparable with wild type cells. Protonophore TCS inhibited CH<sub>4</sub> formation at both pH 6.8 and pH 8.5, respectively; this inhibition was dependent on the presence of Na<sup>+</sup> ions. At low NaCl concentration (1 mM), CH<sub>4</sub> synthesis was completely inhibited by the addition of protonophore TCS. At high NaCl concentration (10 mM) and under slightly

acidic (pH 6.8) or alkaline (pH 8.5) external conditions CH<sub>4</sub> synthesis was observed even in the presence of protonophore TCS (Table I).

It was suggested that in the wild type the Na<sup>+</sup>-translocating ATPase may operate under conditions of limited proton motive force (i.e. at alkaline pH or in the presence of an uncoupler)<sup>3</sup>. Synthesis of cellular ATP driven by methanogenic electron transport was observed under both slightly acidic or alkaline conditions. This process was completely inhibited at both pH values contrary to the wild type cells by the addition of protonophore TCS, and no Na<sup>+</sup> ions dependency of this inhibition was observed (Table I). This probably resulted from the defect in Na<sup>+</sup>-translocating ATPase in the mutant strain.

Membrane potential was determined under slightly acidic (pH 6.8) or alkaline (pH 8.5) conditions. Moreover the effects of relevant cations, ATPase inhibitors and ionophors on Δψ were determined. Values of Δψ were approx. –230 mV at both slightly acidic and alkaline conditions. Under energized conditions (gas phase, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>), Na<sup>+</sup> ions had no effect on Δψ; on the other hand, Na<sup>+</sup> ions specifically dissipated Δψ under non-energized conditions (gas phase, Ar). Δψ was abolished by the addition of valinomycin + KCl. At pH 6.8 in the presence of 10 mM-NaCl protonophore TCS completely dissipated Δψ. At pH 8.0, under the same experimental conditions TCS only partially dissipated Δψ (–150 mV) (Table I). The finding of a protonophore-resistant Δψ at pH 8.5 indicates that at alkaline conditions these cells can switch from H<sup>+</sup>-energetics to Na<sup>+</sup>-energetics, when the proton-motive force becomes limited. Moreover, the results presented in this work supports the hypothesis that a primary Na<sup>+</sup>-translocating pump different from Na<sup>+</sup>-translocating ATPase operates in *M. thermoautotrophicum*.

Table I  
Bioenergetic parameters of the mutant of *M. thermoautotrophicum* under different external conditions

Measured parameter	Addition	pH	
		6.8	8.5
Growth	–	+	–
CH <sub>4</sub>	–	+	+
	TCS, 1 mM-NaCl	–	–
	TCS, 10 mM-NaCl	+	+
ATP	–	+	+
	TCS, 1 mM-NaCl	–	–
	TCS, 10 mM-NaCl	–	–
Δψ	–	–230	–230
	TCS, 10 mM-NaCl	0–60	–150

*This work was supported by the Research Grant VEGA 2/7134/20 from the Slovak Academy of Sciences.*

#### REFERENCES

- Becher B., Müller V.: *J. Bacteriol.* 176, 2543 (1994).
- Šmigáň P., Polák P., Majerník A., Greksák M.: *FEBS Lett.* 420, 93 (1997).
- Šmigáň P., Majerník A., Polák P., Hapala I., Greksák M.: *FEBS Lett.* 371, 119 (1995).

## 15 EXPRESSION OF PUTATIVE GENE CODING FOR Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ANTIPORTER OF *METHANOCOCCUS JANNASCHII* IN *ESCHERICHIA COLI* AND YEAST *PICHIA PASTORIS*

ALAN MAJERNÍK<sup>a</sup>, ROLF DANIEL<sup>b</sup>,  
and GERHARD GOTTSCHALK<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>*Institut of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic,*  
<sup>b</sup>*Abteilung Allgemeine Mikrobiologie, <sup>c</sup>Göttingen Genomics Laboratory, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität, 370 77 Göttingen, Germany*

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters are membrane proteins that couple the circulation of H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> across biological membranes of archaeal, bacterial and eucaryal cells. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity was detected in several methanogens<sup>1</sup>, but the question on the nature of the transporter(s) in these organisms remains open. To provide a functional analysis of methanoarchaeal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, the *nhaJ* (Mj1275) gene coding for a potential Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Methanococcus jannaschii*<sup>2</sup> was selected. In the present report, the attempts to produce the *nhaJ* gene product in bacterial or eucaryotic hosts are described.

The pKKANT plasmid in which the *nhaJ* gene was inserted into the expression vector pKK223-3 (Ref.<sup>3</sup>) was transformed into the *E. coli* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter mutant EP432 (Ref.<sup>4</sup>). The heterologous transcription of the *nhaJ* gene was confirmed by Northern blot analysis of total RNA, but the heterologous production of the *nhaJ* gene product was not detectable under various growth conditions. It was found that 102 of the total 389 codons of the sequence of the *nhaJ* are low-usage codons in *E. coli*. To avoid a low efficiency of translation, we cotransformed pKKANT and the plasmid pUBS520, which harbored the genes encoding the rare *E. coli* tRNAs codons for arginine, into *E. coli* JM109. Subsequently, IPTG induction of heterologous expression of the *nhaJ* resulted in retardation of growth and cell lysis. Further experiments were carried out with the commercially available strain BL21-Codon plus (DE3) RIL [Stratagene]. This strain overproduces the tRNAs that in low concentration restrict translation of heterologous proteins from organisms containing AT-rich genes in *E. coli*. We used a pBluescript SK+ derivative pDD4 (Ref.<sup>3</sup>), in which the *nhaJ* gene was placed under the control of the T7 promoter for transformation into the BL21(DE3) RIL strain. Experiments were performed in buffered glucose medium (pH 7.5). This medium allowed the transformants to grow without protonmotive force<sup>5</sup>. Most of transformants showed partly or fully inhibited growth. Only cells that lost the ability to express the target DNA product were able to grow.

Another expression system based on the yeast *Pichia pastoris* was chosen for further studies. The *nhaJ* gene was fused to the haemagglutinin tag (HA) and cloned into the pPIC9 vector under the control of the strong, methanol-inducible P<sub>AOX1</sub> promoter. The resulting plasmid pPIC9ANT and the cloning vector pPIC9 (control) were transformed and integrated into the *Pichia* chromosome. The expression was induced by addition of methanol and the different fractions of the cell aliquots (crude extract, debris, 100,000× g supernatant and crude membranes) were analyzed by SDS-PAGE or Western blot using the monoclonal anti-[HA] antibody. The *nhaJ* gene

product was not detectable in any of the above mentioned fractions. The cloning region of pPIC9ANT was sequenced. The results showed that the *nhaJ*-HA fusion has been cloned in correct orientation and frame. However, three additional mutations (A/T exchange for G/C) were identified in the coding region of the *nhaJ* gene. It was concluded that none of these mutations were able to prevent a production of the *nhaJ* gene product in *Pichia* cells.

Our results suggested that expression of *nhaJ* gene from strong promoters was highly toxic for different *E. coli* strains. This toxicity was not dependent on the activity of the gene product but on accumulation of the foreign hydrophobic protein inside the *E. coli* cells. In addition, this putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene was not able to complement mutations in the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes of *E. coli* EP432.

*A. M. was supported by a research fellowship from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and a Young scientist fellowship from the Union der Deutschen Akademien der Wissenschaften (supported by the Volkswagen-Stiftung). This work was partly supported by the Research Grant VEGA from the Slovak Academy of Sciences No. 2/7134/20.*

## REFERENCES

1. Deppenmeier U., Müller V., Gottschalk G.: Arch. Microbiol. 165, 149 (1996).
2. Bult J. C., et al: Science 273, 1017 (1996).
3. Quentin T.: *Diploma thesis*. University of Göttingen, Germany 1997.
4. Pinner E., Kotler Y., Padana E., Schuldiner S.: J. Biol. Chem. 268, 1729 (1993).
5. Kinoshita N., Unemoto T., Kobayashi H.: J. Bacteriol 160, 1074 (1984).

## 16 SCREENING OF ENVIRONMENTAL DNA LIBRARIES FOR THE PRESENCE OF GENES CONFERRING Na<sup>+</sup> (Li<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> ANTIPORTER ACTIVITY

ALAN MAJERNÍK<sup>a</sup>, ROLF DANIEL<sup>b</sup>,  
and GERHARD GOTTSCHALK<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>*Institut of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic,*  
<sup>b</sup>*Abteilung Allgemeine Mikrobiologie, <sup>c</sup>Göttingen Genomics Laboratory, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität, 37077 Göttingen, Germany*

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters are the universal devices that couple the circulation of H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup> ions across biological membranes. These enzymes were described and characterized in many microorganisms from different environments. To study the genetic and ecological diversity, we focussed on identification of new genes encoding Na<sup>+</sup>(Li<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter from environmental samples. Environmental DNA libraries from three different soil samples (meadow, sugar beet field, valley of the river Nieme) were constructed recently<sup>1</sup>. Subsequently, these libraries were screened for the presence of genes confer-

ring  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter activity to the *Escherichia coli*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter mutant strains Knabc (Ref.<sup>2</sup>). The screening was performed in selective L(K) medium containing 7.5 mM-LiCl. 75 positives out of approximately 1,480,000 recombinant *E. coli* strains were obtained during the initial screening procedure. In order to confirm the positive phenotype of the clones the plasmids were isolated, retransformed and the resulting *E. coli* strains were screened again on selective plates. 60 recombinant *E. coli* strains conferred a stable phenotype. Restriction analysis revealed that three different groups of plasmid were among them. One of each group (designated pAM1 to pAM3) was selected for further studies. All three corresponding *E. coli* transformants showed growth in the presence of 0.3 M-LiCl and 0.7 M-NaCl.

The inserts have been sequenced and the data were compared to the sequences available in the NCBI databases. The nucleotide sequence of the pAM3 insert was 100 % identical to a 5,050 bp region of the *E. coli* chromosome: This region contained the genes coding for the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (NhaA) and the positive regulator protein NhaR. Interestingly, the antiporter containing region is flanked by insertion sequences (IS). The nucleotide sequences of these elements are almost 100 % identical among various species from bacteria to human.

We observed that the pAM2 contained two plasmids with insert sizes of 9,000 and 1,330 bp, respectively. Further analysis revealed that the bigger plasmid is the same as pAM1 and contained the gene encoding the antiporter activity. The insert of the latter plasmid is currently sequenced and analyzed. In addition, biochemical analysis of membrane vesicles prepared from the corresponding *E. coli* clone (*E. coli*/KNabc/pAM1) exhibited significant  $\text{Li}^+/\text{H}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter activity.

Our screening procedure showed a promising perspective, since we have encountered a new gene encoding an antiporter. In addition, we found the *nhaA* gene, which encodes the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *E. coli*. The latter result confirmed the potential of the used approach. Interestingly, identification of *E. coli* antiporter in a soil sample indicated a horizontal gene transfer of this important bioenergetic device among microorganisms from different environments. This hypothesis is supported by the two conserved IS elements, which were located at both ends of the DNA region harboring *nhaA* of *E. coli*. The first sequencing results of the new gene encoding antiporter revealed only weak similarity to sequences available in the NCBI databases. Thus, we might have encountered a gene encoding a  $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$  antiporter from an organism, which has not been investigated or even cultivated.

*A. M. was supported by a Young scientist fellowship from the Union der Deutschen Akademien der Wissenschaften, (supported by Volkswagen-Stiftung). This work was partly supported by the Research Grant VEGA of Slovak Academy of Sciences No. 2/7134/20. We are grateful to Professor Tomofusa Tsuchiya (Okayama University, Japan) for supplying us with the KNabc mutant strain.*

## REFERENCES

1. Henne A., Daniel R., Schmitz R. A., Gottschalk G.: Appl. Environ. Microbiol. 65, 3901 (1999).
2. Nozaki K., Inaba K., Kuroda T., Tsuda M., Tsuchiya T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 774 (1996).

## 17 IZOLÁCIA GÉNU KÓDUJÚCEHO ADP/ATP TRANSLOKÁTOR V *YARROWIA LIPOLYTICA*

MAREK MENTEL<sup>a</sup>, MARTINA NEBOHÁČOVÁ<sup>a</sup>  
a JORDAN KOLAROV<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, <sup>b</sup>Ústav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská cesta 7, 833 91 Bratislava, Slovenská republika

ADP/ATP translokátor je jadrom kódovaný proteín lokalizovaný vo vnútornej mitochondriálnej membráne. Pre jeho štruktúru platia charakteristiky spoločné pre celú rodinu mitochondriálnych prenášačov<sup>1</sup>. Primárnu štruktúru tvorí reťazec aminokyselinových zvyškov o veľkosti približne 30 kDa, zložený z trojitej tandemovej repetície príbuzných sekvencií. Celý proteín obsahuje šesť hydrofóbných  $\alpha$ -hélixov, ktoré prestupujú lipidickou dvojvrstvou<sup>2</sup>. N-Terminálny aj C-terminálny koniec sú zhodne lokalizované v medzimembránovom priestore mitochondrie. ADP/ATP translokátor je antiporter, ktorý zabezpečuje elektrogénnu výmenu iónov  $\text{ADP}^{3-}$  a  $\text{ATP}^{4-}$  medzi matrixom a cytoplazmou. Je vysoko špecifický a protonizované formy  $\text{ATP}^{3-}$  a  $\text{ADP}^{2-}$ , rovnako ako ióny  $\text{AMP}^{2-}$  netransportuje<sup>3,4</sup>. Pozorovaná interakcia ADP/ATP translokátora s proapoptickým Bax proteínom a vplyv jeho špecifických inhibitorov na mitochondriálny PT pór poukazuje na účasť pri apoptóze<sup>5,6</sup>. Dôležitú úlohu ADP/ATP translokátora vo fyziologických procesoch bunky podčiarkuje jeho spolupráca s voľnými masnými kyselinami pri odpojení oxidatívnej fosforylácie od respirácie preukázaná u cicavcov aj kvasiniek<sup>7,8</sup>. V predkladanej práci popisujeme spôsob izolácie génu kódujúceho ADP/ATP translokátor v dimorfnej, obligátne aeróbnej kvasinke *Yarrowia lipolytica*. Tento alternatívny model kvasinkovej bunky je pre základný výskum zaujímavý z viacerých dôvodov: *i*) ako obligátne aeróbna kvasinka je prístupná genetickým manipuláciám porovnateľným s možnosťami pre fakultatívne anaeróbnu kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*; *ii*) v zložení respiračného reťazca sa od *S. cerevisiae* líši prítomnosťou protón translokujúceho komplexu I; *iii*) keďže sa výskyt viacerých izoformiem dáva do súvisu so schopnosťou anaeróbného rastu, je zaujímavé určiť počet génov kódujúcich ADP/ATP translokátor v *Y. lipolytica*, a *iv*) zistiť, či je funkčný ADP/ATP translokátor esenciálny pre rast aeróbnej kvasinky.

Na základe porovnania piatich nukleotidových sekvencií kvasinkových ADP/ATP translokátorov boli navrhnuté primery rozpoznávajúce vysoko konzervované oblasti. Reakciou PCR sa amplifikoval fragment AAC génu *Y. lipolytica*, ktorý bol po rádioaktívnom značení použitý ako homologná hybridizačná príoba pri prehliadavaní cDNA knižnice *Y. lipolytica* (kmeň W29). Zo získaných 38 klonov sa pri sekundárnej hybridizácii identifikovalo 11 pozitívnych klonov. Na zistenie, ktorý z nich kóduje funkčný ADP/ATP translokátor bola využitá funkčná komplementácia. Rast na neskvasiteľnom zdroji uhlíka je u kvasiniek kritériom funkčnosti ADP/ATP translokátora<sup>9</sup>. Mutant *S. cerevisiae* JLY-73, ktorý má deletovaný AAC2 gén a nie je schopný rásť na neskvasiteľnom zdroji uhlíka, bol transformovaný pozitívnymi klonmi. Štyri z nich funkčne komplementovali rast na neskvasiteľnom zdroji uhlíka. Sekvenáciou jedného pozitívneho klonu bol identifikovaný 915 bp dlhý otvorený čítací rámec, ktorý kóduje

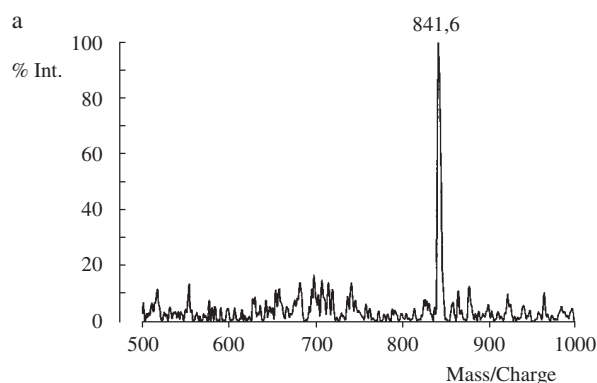


proteín zložený z 305 aminokyselinových zvyškov. Tento gén dostal označenie *YIAAC1*. Aminokyseliny, u ktorých sa preukázala esenciálna funkčná alebo štruktúrna úloha sa podľa očakávania nachádzajú na konzervovaných miestach. Aminokyselinovým zložením sa proteín YIAac1p najviac podobá ADP/ATP translokátoru z vláknitej huby *Neurospora crassa* a kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Po úspešnej identifikácii génu *YIAAC1* sa pristúpilo k jeho disrupcii. Rastom *Y. lipolytica* v tekutom YPD médiu obsahujúcom kyselinu bongrekrovú bola snaha zistiť, či neprítomnosť funkčného ADP/ATP translokátora bude pre túto kvasinku letálna. Prítomnosť kyseliny bongrekrovej neovplyvňovala dobu delenia ani rastový výťažok buniek. Možné sú tieto vysvetlenia: i) funkčný ADP/ATP translokátor nie je esenciálny pre rast *Y. lipolytica*; ii) vzhľadom na aktívny metabolizmus mastných kyselín v *Y. lipolytica* môže dochádzať k eliminácii toxických účinkou kyseliny bongrekrovej touto cestou, alebo pomocou mechanizmu pleiotropnej rezistencie. Súčasná práca sú zamerané na disrupciu génu *YIAAC1* a určenie počtu génov kódujúcich ADP/ATP translokátor v *Y. lipolytica*.

Táto práca bola podporená grantom Slovenskej grantovej agentúry VEGA 1/7285/20.

#### LITERATÚRA

1. Kuan J., Saier M. H.: Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28, 209 (1993).
2. Saraste M., Walker J. E.: FEBS Lett. 144, 250 (1982).
3. Brandolin G., Le Saux A., Roux P., Trézéquet V., Fiore C., Schwimmer C., Dianoux A. C., Lauquin G. J. M., Vignais P. V.: Soc. Gen. Physiol. Ser. 51, 173 (1996).
4. Brustovetsky N., Bamberg E., Gropp T., Klingenberg M.: Biochemistry 36, 13865 (1997).
5. Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J. M., Susin S. A., Vieira H. L. A., Prévost M.-Ch., Xie Z., Matsuyama S., Reed J. C., Kroemer G.: Science 281, 2027 (1998).
6. Halestrap A. P., Woodfield K.-Y., Connern C. P.: J. Biol. Chem. 272, 3346 (1997).
7. Skulachev V. P.: FEBS Lett. 294, 158 (1991).
8. Polčic P., Šabová L., Kolarov J.: FEBS Lett. 412, 207 (1997).
9. Klingenberg M., Nelson D. R.: Biochim. Biophys. Acta 1187, 241 (1994).



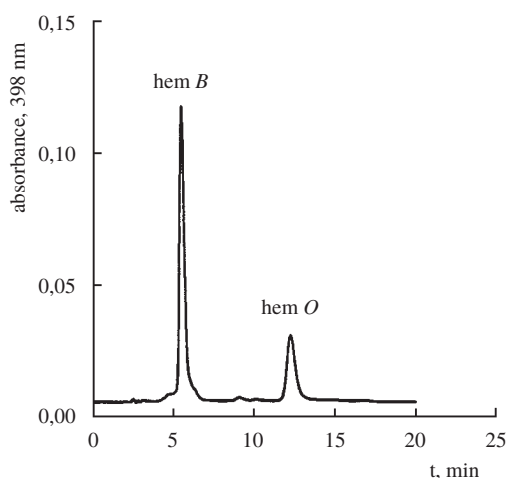
#### 18 PRŮKAZ PŘÍTOMNOSTI HEMU O U BAKTERIE PARACOCUS DENITRIFICANS POMOCÍ HPLC A MALDI-TOF MS

PETR KAPLAN<sup>a</sup>, IGOR KUČERA<sup>b</sup>  
a JOSEF ČÁSLAVSKÝ<sup>c</sup>

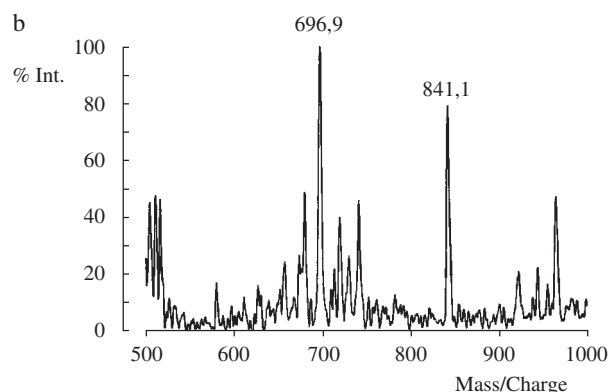
<sup>a</sup>Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, 662 43 Brno, <sup>b</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, 611 37 Brno, <sup>c</sup>Ústav analytické chemie AV ČR, 611 42 Brno

Prítomnosť hemu O v buňkách denitrifikujících bakterií byla a je dlouho předmětem diskusí<sup>1</sup>. Tento hem byl objeven u *E. coli* jako součást terminální oxidasy schopné vázat jak O<sub>2</sub>, tak CO. V komplexu s oxidem uhelnatým se vyznačuje charakteristickou absorpcí v Soretově oblasti (maximum při 417 nm a minimum při 432 nm).

Jeho existence u bakterie *P. denitrificans* byla dlouho zpochybňována, řada autorů jej považovala za hem typu B schopný vázat kyslík<sup>2</sup>. Hem O se od hemu B odlišuje přítom-



Obr. 1. Chromatogram hemů z extraktu *E. coli* metodou HPLC. Na kolonu bylo aplikováno 40  $\mu$ l finálního extraktu odpovídající 15 mg bakteriální sušiny. Kolona CGC 150 $\times$ 3,3 mm, Sepharon SIX C18 (5  $\mu$ m). Mobilní fáze methanol–kyselina octová–voda 70:17:13 (v/v/v), průtok 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. VIS detekce 398 nm



Obr. 2. MALDI-TOF hmotnostní spektra frakce hemu O z *E. coli* (a) a frakce z *P. denitrificans* odebrané ve stejném tR (b). Aplikováno bylo 0,8  $\mu$ l odparku rozpuštěného v mobilní fázi a 0,8  $\mu$ l roztoku matrice (sinapinová kyselina v 0,1 % TFA-acetonitril, 60:40, v/v). Měřeno na hmotovém spektrometru Shimadzu-Kratos Compact MALDI IV s N<sub>2</sub> laserem (337 nm, puls 3 ns), délka trubice 1 m, ionty urychlující napětí 20 kV



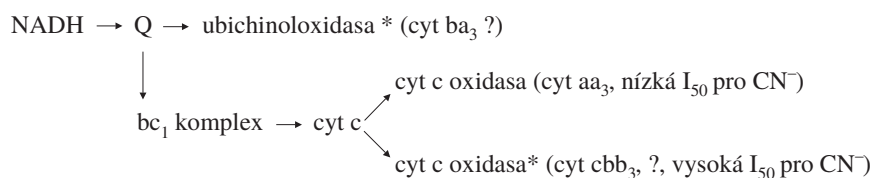


Schéma 1

ností farnesylového zbytku způsobujícího jeho lipofilní charakter a lze jej proto od hemu B dobře separovat kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi (obr. 1). Objektivně byl pak hem *O* u *P. denitrificans* prokázán analýzou příslušné separované frakce hmotovou spektrometrií, jak znázorňuje obr. 2 ( $M_r$  autentického hemu *O* je 839).

Hem *O* se vyskytuje ve vyšší hladině u této bakterie, je-li pěstována za anaerobních podmínek. Jeho funkce však nebyla dosud uspokojivě vysvětlena. Jednou z možností je, že slouží jako prekurzor syntézy hemu *A* podle předpokládané metabolické cesty: protohem  $\rightarrow$  hem *O*  $\rightarrow$  hem *A*. Při nízkých hladinách kyslíku by nemohlo dojít k oxygenaci hemu *O*, který se tak hromadí v buňce. Při přechodu z anaerobních do aerobních podmínek je pak pokles hladiny hemu *O* provázen

\* obsah zvýšený při limitované aeraci

paralelním zvyšováním hladiny hemu *A*. Druhou možnou funkcí hemu *O* může být, že je, podobně jako u *E. coli*, prostetickou skupinou některé z terminálních oxidas, které se syntetizují za podmínek limitované aerace – viz schéma 1.

Řešeno v rámci výzkumného záměru MŠMT (MSM 143100005).

#### LITERATURA

1. Kaplan P., Erlebachová P., Kučera I.: *Scripta Medica* 1, 19 (1999)
2. de Gier J.-W. L., Lubben M., Reijnders N. M., Tipker C. A., Slotboom D. J., van Spanning R. J. M., Stouthamer A. H., van der Oost: *Mol. Microbiol.* 13, 183 (1994).

## 01 PERSPEKTIVY MINIATURIZACE V LABORATORNÍ DIAGNOSTICE

BEDŘICH FRIEDECKÝ<sup>a</sup>, PETR ŠTERN<sup>b</sup>  
a JAROSLAVA VÁVROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, 500 36 Hradec Králové, <sup>b</sup>Ústav klinické biochemie, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. Lékařská fakulta UK, Karlovo n. 32, 121 11 Praha

V posledním desetiletí se aplikace miniaturizované přístrojové techniky a technologie neustále rozšiřuje. K miniaturizaci vedla řada důvodů: ekonomická úspora reagensů a biologického materiálu, rychlejší odezva, možnost řádového zvýšení analytické kapacity a zjednodušení práce. Nástup mikroanalytických technologií je pozitivním výstupem pokroku v mikroelektronice. Přestože vývoj v oblasti miniaturizace je v posledních letech velmi široký, zůstává většinou předmětem základního výzkumu, do praxe laboratorní diagnostiky postupně proniká jen omezený počet postupů.

K již používané miniaturizované technologii se bezesporu řadí mikročipy. V oblasti *in vitro* jde nejčastěji o mikročipy pracující na principu kapilární elektroforézy používané k detekci produktů DNA. Dalším nadějným polem působnosti je proteomová analýza s využitím kombinace proteinových mikročipů a hmotnostní spektrometrie. Převedení výsledků tohoto výzkumu do průmyslové praxe umožní získat obsáhlé a dosud citelně chybějící znalosti o uspořádání epitopů a paratopů, které by umožnily přechod řady oblastí klinické imunochemie z empirické na exaktní bázi. Mikročipy se začínají intenzivněji uplatňovat také při sledování metabolických pochodů *in vivo*, dokonce až na úrovni sledování buněčné komunikace. Příkladem mohou být implantáty mikročipů pro kontinuální sledování koncentrace glukosy, parciálního tlaku kyslíku apod.

Mikropole (microarray) dovoluje diskrétní umístění velkého počtu receptorů (senzorů) na velmi malé ploše neutrálního nosiče. Největší přínos pro laboratorní diagnostiku při aplikaci mikropolí očekáváme u imunochemických postupů. Z pohledu blízké budoucnosti lze předvídat zásadní průlom v aplikaci imunochemických metod díky výraznému snížení provozních nákladů o 1–2 řády, přičemž současné průměrné náklady na imunochemické vyšetření se vyčísľují ve stokrát. Průnik technologie mikropolí do imunochemie bude nutně vyžadovat globální inovaci současné přístrojové techniky. Imunochemické metody vykazují vynikající úroveň analytické selektivity, jejímž důsledkem je vysoká úroveň diagnostické specifčnosti. Rozšíření imunochemických metod bez ekonomických zábran přispěje ke zvýšení kvality diagnostického procesu. Zjednodušení obsluhy umožňuje použít tuto technologii u lůžka nemocného a na operačních sálech (POCT).

Mikrokomůrky vysoké hustoty jsou dnes široce využívány např. v hybridomové technologii při přípravě monoklonálních protilátek nebo při detekci produktů DNA analýz. Tyto postupy umožňují rychlou a levnou detekci. Vedle malé spotřeby reagensů je výhodou také možnost získání velkého počtu výsledků v krátkém čase. To je neocenitelné při sledování úspěšnosti vzniku nestabilních struktur, detekci bodových mutací, mapování oblastí genomu apod.

## 02 SPEKTRÁLNÁ DEFINÍCIA TELOVÝCH TEKUTÍN – PRAKTICKÁ APLIKÁCIA

KATARÍNA DUBAYOVÁ<sup>a</sup>, JAROSLAV KUŠNÍR<sup>a</sup>,  
LUCIA LEŠKOVÁ<sup>a</sup> a MILAN KUČHTA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej chémie a biochémie LF UPJŠ, <sup>b</sup>Detská klinika LF UPJŠ a FNsP, Lekárska fakulta UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská republika

Analýza telových tekutín, najmä krvi a moča, je neoddeliteľnou súčasťou stanovenia diagnózy pacienta. Telové tekutiny sú komplikované zmesi rôznych chemických zlúčenín, ktorých detailné zloženie sa nedá často presne definovať. Filozofia ich analýzy je založená najmä na sledovaní koncentrácie látok, ktoré sú pre danú tekutinu charakteristické, prípadne na identifikácii a stanovení zlúčenín, ktoré sú markermi predpokladanej diagnózy. Tieto čiastkové analýzy (ich počet môže byť rôzny) vytvárajú predstavu o zložení telovej tekutiny, ale necharakterizujú ju komplexne, ako jeden celok.

Takúto charakterizáciu umožňuje grafická definícia, tj. grafický záznam vhodne zvolených parametrov, ktoré charakterizujú komplikovanú zmes ako jeden celok<sup>1,2</sup>. Najvýstižnejšiu grafickú definíciu takej zmesi umožňuje synchronný fluorescenčný fingerprint<sup>3,4</sup>. Vrstevnicová mapa vytvorená počítačovým spracovaním série synchronných spektier, kvalitatívne (poloha fluorofóru na mape) aj kvantitatívne (hustota vrstevníc) graficky definuje zložitú zmes ako jednu entitu, komplexne ju charakterizuje a umožňuje maximálne využiť všetky informácie o jej zložení<sup>4</sup>. Porovnaním dvoch záznamov sa dajú veľmi rýchlo odhaliť kvalitatívne aj kvantitatívne zmeny v zložení komplikovaných zmesí.

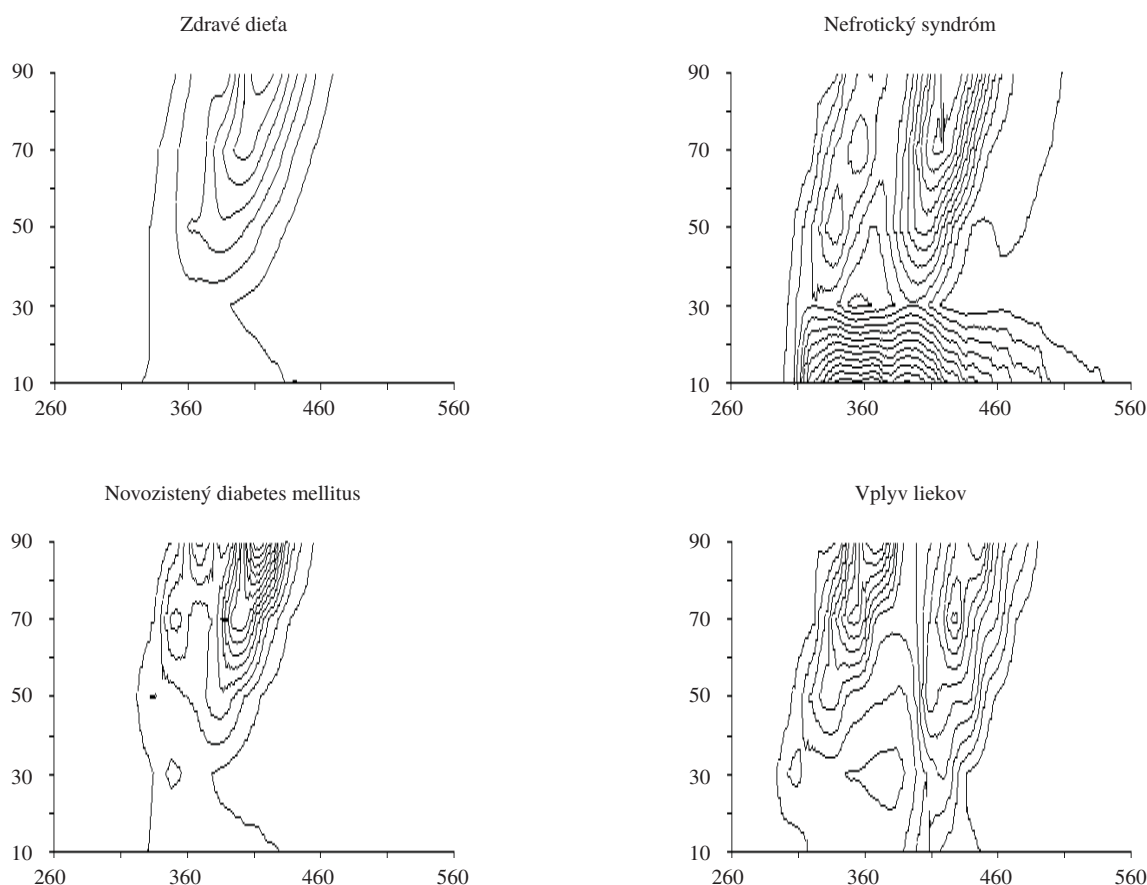
Grafická charakterizácia telových tekutín ako jedného celku a hľadanie odlišností oproti definovanému štandardu, predstavuje novú filozofiu v analýze biologického materiálu.

Synchronný fluorescenčný fingerprint sme použili na grafickú definíciu moča detských pacientov (obr. 1). Analýzou moča zdravých detí sme definovali fingerprint normálneho fyziologického moča (štatistický priemer). Výrazne zmenený fingerprint sme zaznamenali u detí s rôznym ochorením obličiek, moč u novozisteného diabetes mellitus mal tiež špecifický fingerprint. Prítomnosť rôznych liekov, resp. ich metabolitov sa prejavila atypickou vrstevnicovou mapou.

Analýza moča metódou synchronného fluorescenčného fingerprintu je veľmi rýchla. Nevyžaduje zdĺhavé izolačné postupy, umožňuje priame meranie zriedenej vzorky bez prídavku reagensů. Okamžite poskytuje komplexný obraz o kvalitatívnom aj kvantitatívnom zložení moču, a tým usmerňuje prípadné ďalšie konkrétne analýzy. Lekárovi môže pomôcť v určovaní, potvrdení, resp. vyvrátení diagnózy.

### LITERATÚRA

1. Rendall D.: *Fluorescence and Phosphorescence*. Acol, London 1987.
2. Phelan V.: *International Laboratory News* 7, 12 (1994).
3. Kušník J., Dubayová K., Makuchová V.: *Chem. Papers* 52 (Focus Issue), 291, (1998).
4. Dubayová K., Lešková L., Kušník J.: *Cesk. Slov. Farm.* 48, 77 (1999).



Obr. 1. Grafická definícia moča pomocou synchronného fluorescenčného fingerprintu. Porovnanie fingerprintov močov detí s rôznymi diagnózami

### 03 MONOCLONAL ANTI-LACTOSYLCERAMIDE ANTIBODY (CDw17) – COMMENT ON THE SPECIFICITY AND SUITABILITY FOR *IN SITU* LIPID IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION

HELENA HŮLKOVÁ<sup>a</sup>, BEFEKADU ASFAW<sup>a</sup>, JANA LEDVINOVÁ<sup>a</sup>, KRISTIAN KOUBEK<sup>b</sup>, and MILAN ELLEDER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2,*

<sup>b</sup>*Institute of Hematology and Blood Transfusion, U nemocnice 1, 128 08 Prague 2*

Lactosylceramide (LacCer) is a normal constituent of cell membranes of various cells<sup>1,2</sup>. It is also known to be concentrated in secondary granules of granulocytes<sup>3</sup>. LacCer is increased in various tissues in several lysosomal storage disorders<sup>4</sup>, especially in deficiency of prosaposin<sup>5</sup>. We followed LacCer storage in Niemann-Pick type C disease and in a set of control tissues using both immunohistochemistry and lipid chromatography. Among the four CDw17 clones tested, only one gave results satisfactory for reliable immunohistochemistry. The specificity for lipid detection was tested on TLC using

a series of glycolipids (glucosylceramide, galactosylceramide, digalactosylceramide, globotriaosylceramide, globoside, sulphatide, GM1-GM3 gangliosides) and purified total lipid extracts from the following tissues: liver, spleen, kidney, brain, adrenal glands and erythrocytes. Among all the glycolipids tested, only LacCer gave positive immunodetection on TLC. The staining was partially blocked by lactose but completely resistant to sucrose. In tissues the best results were achieved in unfixed frozen samples (cryostat sections). The specificity was further checked, to exclude nonlipid participation, by the following lipid extraction sequence carried out at room temperature: 50 % ethanol, 10 minutes; chloroform:methanol:water 4:8:3, 30 minutes; chloroform:methanol 2:1, 30 minutes. The detection protocol (standard blocking procedures are not mentioned) was as follows: primary antibody (undiluted hybridoma fluid) overnight at 4 °C, secondary antibody (goat-anti mouse IgM, Pierce, USA) 1 h, 37 °C, followed by DAKO LSAB<sup>R</sup> Kit (anti- mouse, rabbit, goat, DAKO, Denmark), and DAB reaction. This antibody allowed for the first time *in situ* localisation of LacCer, which had been proven to be stored in Niemann-Pick type C by lipid chromatography of tissue extracts. There was massive LacCer accumulation restricted to cortical neurons (negative in controls), strong storage in hepatic Kupffer cells and in spleen macrophages (definite in-

crease against mild-medium strong signal in controls) and slight storage in both spleen and liver sinusoidal endothelium. Storage in hepatocytes was minimal. In contrast to the brain neurons, there was virtually no LacCer detectable in peripheral (gut) neurons despite their affection by the storage process. In control appendix the staining of myenteric plexi was strong with massive positivity in neurons. This staining was resistant to lipid extraction and could be considered as a lactose rich glycoprotein. This finding is currently under investigation.

*This work was supported by the grants FRVŠ No. 1899/2000 and GAUK No. 37/2000/C.*

#### REFERENCES

1. Stein K. E., Marcus D. M.: *Biochemistry* 15, 5285 (1977).
2. Fujimoto T.: *J. Histochem. Cytochem.* 44, 929 (1996).
3. Symington F. W., Murray W. A., Bearman S. I., Hakomori Sen-itiroh: *J. Biol. Chem.* 262, 11356 (1987).
4. Chen Chii-Shiang, Patterson M. C., Wheatley C. L., O'Brien J. F., Pagano R. E.: *Lancet* 354, 901 (1999).
5. Harzer K., Paton B. C., Poulos A., Kustermann-Kuhn B., Roggendorf W., Grisar T., Popp M.: *Eur. J. Pediatr.* 149, 31 (1989).

#### 04 JEDNODUCHÁ ULTRAMIKROMETÓDA NA STANOVENIE JÓDU V MOČI PRE URČOVANIE SATURÁCIE ORGANIZMU JÓDOM

ELENA ŠEBÖKOVÁ<sup>a</sup>, PAVEL LANGER<sup>a</sup>,  
LUDMILA KOŠŤÁLOVÁ<sup>b</sup>, JIŘÍ BENDL<sup>c</sup>  
a IWAR KLIMEŠ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratórium diabetu a výživy, Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, <sup>b</sup>I. Detská klinika, Detská fakultná nemocnica, Bratislava, Slovenská republika, <sup>c</sup>Analytika s.r.o., Praha, Česká republika

Jód ako jeden z veľmi dôležitých mikroelementov sa v živých organizmoch nachádza vo veľmi nízkych koncentráciách. Preto bolo treba prekonať veľké analytické problémy, kým sa podarilo vypracovať metódy na dostatočne citlivé stanovenie jódu v biologických materiáloch. Stanovenie jódu v moči má v súčasnosti najmä epidemiologický význam, a využíva sa na nepriame zistenie saturácie organizmu jódom, čo ďalej slúži na hodnotenie stavu štítnej žľazy u danej populácie. Podľa odporúčaní organizácie „International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders“ (ICC/IDD) sa považuje príjem jódu za dostatočný, ak sa zistí v tom istom čase u približne 50 obyvateľov istého územia hodnota mediánu jodúrie medzi 100 a 200  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

Cieľom tejto práce bolo zavedenie jednoduchej, reprodukovateľnej, finančne nenáročnej, a rýchlej metódy na stanovenie jodúrie, ktorá by sa dala rutínne využívať na monitorovanie saturácie organizmu jódom.

Spektrofotometrická metóda<sup>1</sup>, ktorú odporúča na stanovenie jodúrie ICC/IDD, je založená na kyslom spaľovaní vzorky moču s kyselinou chloristou pri regulovanej teplote 110–115 °C v termobloku po dobu 60 minút. Po ochladení spaľovaných vzoriek sa vykonáva farebná Sandellova-Kolthoffova<sup>2</sup> reakcia

za presne definovaných časových a teplotných podmienok. Jej princípom je redukcia štvormocného céru ( $\text{Ce}^{4+}$ ) síranu céričito-amónneho žltej farby, ktorý sa úmerne prítomnej koncentrácii jódu vo vzorke redukuje na trojmocný ( $\text{Ce}^{3+}$ ), pričom sa súčasne oxiduje trojmocný arzén ( $\text{As}^{3+}$ ) oxidu arzenitého na päťmocný ( $\text{As}^{5+}$ ). Jód pri tejto reakcii pôsobí ako katalyzátor. Reakcia sa zastavuje pridaním roztoku brucínu, po ktorom nasleduje spektrofotometria pri vlnovej dĺžke 410 nm. Koncentrácie jódu sa odčítavajú z kalibračnej krivky rôznych koncentrácií roztoku jodičnanu draselného. Pri hmotovej spektroskopii sa nariadené vzorky moču merajú na hmotnostnom spektrometri s indukčne viazaným plazmatom ICP-MS typu UltraMass firmy Varian (Austrália). Vzorky sa rozprášia do odparovaného kvapalného argónu. Jód sa meria uprostred píku  $m/z = 127$  amu. Doba zotrvania na meranom bode je 10 000 ms. Meranie obsahovalo 50 skenov v piatich blokoch. Kalibračné roztoky o koncentracii jódu 10, 20, 50, 100 a 500  $\mu\text{g.l}^{-1}$  sa pripravujú riedením zásobného kalibračného roztoku jódu Astatol.

Zistili sme, že spektrofotometrické stanovenie jódu je najmä v rozpätí koncentrácií 50–200  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dostatočne presné. To vyplýva v prvom rade z paralelných stanovení viacerých vzoriek moču ako aj zo stanovenia koncentrácie jódu v riedených vzorkách a tiež zo spätných stanovení pridaných množstiev jódu. Reprodukovateľnosť metódy sa potvrdila pomerne nízkym rozptylom pri opakovanom stanovení tých istých vzoriek. Pomocou porovnania výsledkov tejto metódy s principiálne odlišnou, avšak objektívne presnou metódou hmotovej spektrometrie sa napokon zistilo, že najmä v rozpätí 50–150  $\mu\text{g.l}^{-1}$  dávajú hodnoty koncentrácie jódu vysoko významnú koreláciu s hodnotami zistenými pomocou hmotovej spektrometrie. Výsledky poslednej metodiky možno pritom považovať za veľmi presné a takmer totožné s absolútnym obsahom jódu v sledovaných vzorkách.

*Autori ďakujú za čiastočnú finančnú podporu grantu VEGA 2-721020 a f. Merck Slovensko, s.r.o.*

#### LITERATÚRA

1. Wawschinek O., Eber E., Petek P., Wakonig P., Gurakerv A.: *Ber. Oster. Ges. f. Klin. Chem.* 8, 13 (1985).
2. Sandell E. B., Kolthoff I. M.: *Mikrochim. Acta* 1, 9/25 (1937).

#### 05 HEPARIN INDUCED THROMBOCYTOPENIA: A FUNCTIONAL ASSAY USING ESTIMATION OF RELEASED SEROTONIN BY HPLC METHOD

JIŘÍ SUTTNAR, LEONA MÁŠOVÁ,  
PETRA KOŘÍNKOVÁ, JAN EVANGELISTA DYR,  
and HANA BOLCKOVÁ

*Institute of Hematology and Blood Transfusion, U nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic*

Heparin induced thrombocytopenia (HIT) is a major complication of heparin therapy<sup>1</sup>. This iatrogenic complication occurs more frequently with unfractionated heparin but is also observed with low molecular weight heparin<sup>2</sup>. HIT is caused by immunoglobulin – usually IgG – that becomes detectable



five or more days following exposure to heparin. The major target antigen is a macromolecular complex comprised of heparin (or other high-sulfated oligosaccharides) and platelet factor 4 (PF4) that binds to the platelet surface. In the presence of high heparin concentrations, the complexes are disrupted and displaced away from the platelet surface.

Radioactive ( $^{14}\text{C}$ ) serotonin (5-HT) release from washed platelets is a currently used method (SRA) for estimation of HIT (Ref.<sup>3</sup>). We have developed an HPLC method for serotonin analysis. The column is CGC SGX C18, 5  $\mu\text{m}$ , 150 $\times$ 3 mm (TESSEK, Prague, Czech Republic), operated isocratically at 40  $^{\circ}\text{C}$  with flow-rate of 0.5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  and with fluorimetric detection ( $E_x = 270 \text{ nm}$ ,  $E_m = 340 \text{ nm}$ ). The mobile phase is 100 mM phosphoric acid, 5 mM hexane sulfonic acid, pH 2.5 (with triethylamine), 14 % (v/v) methanol.

Two point test with low heparin concentration (0.1  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ , final) and high heparin concentration (100  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ , final) was used. The washed platelets in albumin-free Tyrode's solution (pH 7.4) were incubated (75  $\mu\text{l}$ ) in microtiter wells with test serum (20  $\mu\text{l}$ ) and heparin (5  $\mu\text{l}$ ) at the presence of imipramine and ascorbic acid (5  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{M}$  imipramine and 4 mM ascorbic acid) for 60 min at room temperature. The release reaction was terminated by adding of 100  $\mu\text{l}$  of 0.5 % EDTA. The platelets were centrifuged for 5 minutes at 2000 g and 150  $\mu\text{l}$  of the supernatant was removed, proteins were precipitated by perchloric acid, centrifuged, and 20  $\mu\text{l}$  of supernatant was injected into the chromatograph. The test is positive when greater than 20 % release of 5-HT occurs with low-dose heparin and patient serum while less than 20 % release of 5-HT occurs with high-dose heparin and patient serum. The method design makes it possible to perform simultaneously also heparin-induced platelet activation (HIPA) assay. Preliminary data show that there is a correlation of SRA with HIPA, and with GTI-PF4 ELISA assay (GTI, USA) for detection of antibodies against PF4 – polyvinylsulfonate (mimics heparin).

*This work was supported by grants from IGA MZ ČR: NI/6063-3 and 4809-3.*

## REFERENCES

1. Warkentin E. V.: *Ann. Rev. Med.* 50, 129 (1999).
2. Amiral J., Marfaig-Koka A., Poncz M., Meyer D.: *Platelets* 9, 77 (1998).
3. Sheridan D., Carter C., Kelton J. G.: *Blood* 67, 27 (1986).

## 06 HPLC METHOD FOR MEASUREMENT OF CATECHOLAMINES IN RABBIT ADRENAL MEDULLA

TERÉZIA KALNOVIČOVÁ<sup>a</sup> and PETER TURČÁNI<sup>b</sup>

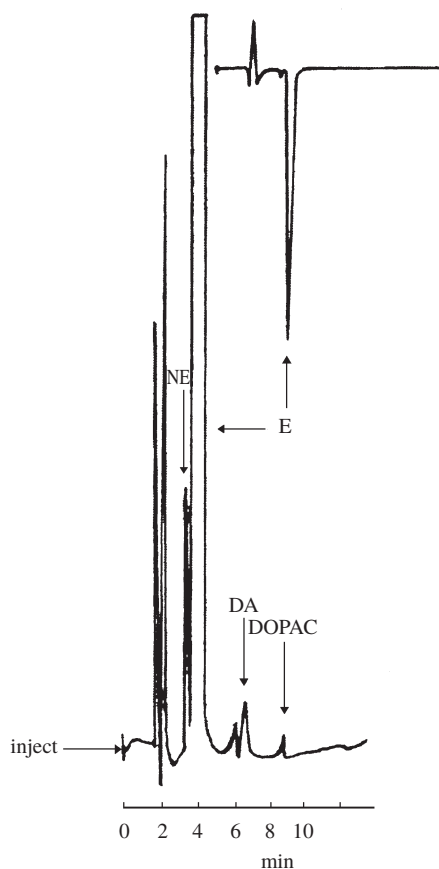
<sup>a</sup>*Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Chemistry, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava,* <sup>b</sup>*1<sup>st</sup> Department of Neurology, Medical Faculty, Comenius University, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava, Slovak Republic*

Measurements of catecholamines and their metabolites in biological tissues can provide useful information regarding

their role in various physiological and pathological situations. Several methods for quantification of catecholamines have been reported, but none of these methods has been found optimal. Here we report a new, simple, and sensitive HPLC method for quantifying catecholamines in 10  $\mu\text{l}$  of adrenal medulla extracts.

**Chromatographic conditions:** The HPLC unit consisted of a pump (Model 610; Waters, USA), hand operated injector (Waters, USA), an amperometric detector (LC-4B, BAS, USA), and a strip-chart recorder (Model SE120; BBC Goerz Metrawatt, Vienna, Austria). The oxidation potential of the electrode (glassy carbon) was adjusted at 0.6 V against Ag/AgCl reference electrode. Sensitivity of the detector was kept at  $sd = 1 \text{ nA}$ . The isocratic separation was carried out on Radial Pak C<sub>18</sub> column (type 8NV, particle size 5  $\mu\text{m}$ , 100 $\times$ 8 mm I.D.; Waters, USA). A Guard Pak column (Corasil packing, type II, 37–50  $\mu\text{m}$ , Waters, USA) was used as a precolumn. The mobile phase consists of 0.1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $2.7\times 10^{-4}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $5.7\times 10^{-3}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  sodium heptansulphonate,  $5.2\times 10^{-2}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  triethylamine and 5 % acetonitrile (v/v), pH 2.3.

Adrenal medulla samples removed from rabbits under thiopental anesthesia were homogenized in 0.2  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{HClO}_4$  (20 mg of the tissue per 1ml of  $\text{HClO}_4$ ), centrifuged for 20 min



**Fig. 1. HPLC chromatogram of epinephrine (E), norepinephrine (NE), and dopamine (DA) in adrenal medulla extract sample chromatographed on the Radial Pak C<sub>18</sub> column (100 $\times$ 8 mm I.D.). The sample contained 25.5  $\mu\text{g}$  of NE, 886.7  $\mu\text{g}$  of E, and 3.1  $\mu\text{g}$  of DA per gram of adrenal medulla**

at 10 000 rpm, and 10 µl of supernatant was used for chromatography. Fig. 1 depicts a representative chromatogram of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in adrenal medulla extract. Optimal composition of the mobile phase was determined by checking three parameters: pH, concentration of organic modifier (acetonitrile), and concentration of ion-pairing reagents<sup>1</sup>. Epinephrine, norepinephrine, dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the chromatogram were identified by comparing the retention times for the pure substances dissolved in 0.1 mol.l<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> and by the standard addition technique. The detection limits, defined as two times the baseline noise, were 39 pg for epinephrine, 42 pg for norepinephrine and 25.4 pg for dopamine. A linear detector response for catecholamines was observed between 0.3–100 ng. The intra- and interassay coefficients of variation were less than 5 %.

Described method provides a rapid approach to the examination of catecholamines concentrations in adrenal medulla extracts. The sensitivity is sufficient to detect as little as 0.3 pmol of these substances. The precision is acceptable, not exceeding 6 %. Given the absence of any cumbersome specimen pretreatment procedure, the method is suitable for studying the role of adrenal catecholamines in various physiological and pathological states.

*The Ministry of Education grant no. 1/4132/97 supported this study.*

#### REFERENCES

1. Kalnovičová T., Čulman J., Baláž V.: *Biológia* 44, 359 (1989).

#### 07 THE CHANGES IN ADRENAL MEDULLA CATECHOLAMINE CONTENT IN RABBITS WITH HEART FAILURE TREATED BY CAPTOPRIL

TERÉZIA KALNOVIČOVÁ<sup>a</sup>, MARIÁN TURČÁNI<sup>b</sup>, and PETER TURČÁNI<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Chemistry, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava,* <sup>b</sup>*Institute of Pathophysiology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava,* <sup>c</sup>*1<sup>st</sup> Department of Neurology, Medical Faculty, Comenius University, Mickiewiczova 13, 81369 Bratislava, Slovak Republic*

Experimental heart failure due to haemodynamic overload is associated with reduction of myocardial catecholamine content, decreased activity of catecholamine metabolizing enzymes, and decreased content of catecholamines in adrenal medulla<sup>1</sup>. Adrenal medulla is site of interaction between renin-angiotensin system (RAS) and sympathetic system<sup>2,3</sup>. Angiotensin II by blocking its receptors in adrenal medulla stimulates the release of catecholamines and increases the plasmatic level of catecholamines<sup>4</sup>. To gain insight in the interactions between RAS and sympathetic system during development of cardiac hypertrophy and heart failure, we analyzed the adrenal

medulla content of catecholamines in rabbits with heart failure due to haemodynamic overload treated by captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor.

Adrenal medulla samples removed from rabbits under thiopental anesthesia were homogenized in 0.2 mol.l<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> (20 mg of the tissue per 1ml of HClO<sub>4</sub>), centrifuged for 20 min at 10 000 rpm, and 10 µl of supernatant was used for HPLC chromatography with amperometric detection<sup>5</sup>. Adrenal medulla samples were obtained from rabbits with haemodynamic cardiac overload induced by aortic regurgitation<sup>6</sup> at the stage of development of cardiac hypertrophy. The rabbits were separated according to the treatment and clinical state in 4 groups: Z – control group, Z+C – control group after captopril treatment (6 mg.kg<sup>-1</sup>, i.m.), HF – rabbits with heart failure, HF+C – rabbits with heart failure after captopril treatment. Results are presented as arithmetic mean ±SD. Data were analyzed with standard statistical methods (goodness-of-fit test, F-test), and the Mann-Whitney test was used for statistical comparison of differences in the means.

In Table I the concentration of catecholamines in adrenal medulla extracts of healthy rabbits and rabbits with heart failure are presented. Significantly changed concentrations were observed only in rabbits with heart failure without captopril treatment. We found no significant changes in adrenal medulla catecholamine content in animals with heart failure treated by captopril. We hypothesized that captopril inhibits catecholamine release by blocking angiotensin II receptors on medullary chromaffin cells.

Table I

The rabbit adrenal medulla content of epinephrine, norepinephrine and dopamine after captopril treatment. Z – control group, HF – rabbits with heart failure, Z+C, HF+C – after captopril treatment

Group	n <sup>a</sup>	Epinephrine [µg.g <sup>-1</sup> ]	Norepinephrine [µg.g <sup>-1</sup> ]	Dopamine [µg.g <sup>-1</sup> ]
Z	13	955.5±307.9	38.7±23.0	4.55±1.64
HF	8	939.5±170.8	18.6±5.9 <sup>b</sup>	2.81±0.74 <sup>c</sup>
Z+C	11	1005.4±284.3	23.6±8.8	3.34±1.31
HF+C	9	1055.4±387.2	26.7±11.4	3.87±1.4

<sup>a</sup> Number of animals, <sup>b</sup> p<0.05, <sup>c</sup> p<0.01 (comparison between Z and HF)

*The Ministry of Education grant No. 1/4132/97 supported this study.*

#### REFERENCES

1. Fízeľ A., Kalnovičová T., Fízeľová A., Baláž V., Turčáni M.: *Physiol. Bohemoslov.* 38, 532 (1989).
2. Belloni A. S., Andreis P. G., Gottardo G., Malendowicz L. K., Nussdorfer G. G.: *Endocr. Res.* 24, 1 (1998).
3. Dendorfer A., Raasch W., Tempel K., Dominiak P.: *Basic Res. Cardiol.* 93, 24 (1998).
4. Martineau D., Lamouche S., Briand R., Yamaguchi N.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77, 367 (1999).

5. Kalnovičová T., Turčáni P.: Chem. Listy 94, 8 (2000).
6. Fízel A., Fízelová A.: Z. Kreisl-Forsch. 58, 1115 (1969).

## 08 KARDIÁLNÍ MARKERY VČERA A DNES

PETR ŠTERN<sup>a</sup>, BEDŘICH FRIEDECKÝ<sup>b</sup>  
a JAROSLAVA VÁVROVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. Lékařská fakulta UK, Karlovo n. 32, 121 11 Praha, <sup>b</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, 500 36 Hradec Králové

Kardiovaskulární choroby jsou na prvním místě v seznamu příčin úmrtí v industrializovaných zemích. Příspěvek klinické laboratoře k diagnóze spočíval doposud ve stanovení katalytických koncentrací některých enzymů. Je možno pozorovat vývoj od používání nespecifických enzymů stanovovaných nespolehlivými metodami (AST) k relativně specifickým enzymům (CK, LD), izoenzymům (CK-MB, LD1) a jejich izoformám (CK-MB1, CK-MB2). Měření katalytických koncentrací enzymů vždy více či méně spolehlivě přispívá pouze k diagnostice akutního infarktu myokardu a není schopno spolehlivě detekovat menší poškození myokardu.

V posledních pěti letech došlo k významným změnám v biochemické diagnostice srdečních chorob. Tyto změny jsou jednak důsledkem expanze imunochemických metod do rutinní laboratorní praxe a také objevu nových vysoce specifických kardiálních markerů – troponinů. Nástup imunochemických technik umožnil novou kvalitu analytických výsledků (např. stanovení myoglobinu), nový pohled na zastoupení enzymů (hmotnostní koncentrace CK-MB) a v poslední době také velmi rychlou analytickou odezvu (do 10 min).

V roce 1999 bylo publikováno doporučení Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC) o používání biochemických markerů v diagnostice srdečních chorob. Toto doporučení pracuje se dvěma markery. První z nich je časný marker myoglobin. Vyznačuje se vysokou klinickou senzitivitou, nízkou specifičností a diagnostickým oknem 2–12 h po nástupu symptomů. Druhým, definitivním markerem je některý z obou troponinů: troponin T (cTnT) nebo troponin I (cTnI). Vykazují vysokou specifičnost i senzitivitu a široké diagnostické okno v intervalu 4 h–7 dní. Zcela novou možností diagnostického využití troponinů je schopnost diagnózy menších srdečních poškození typu nestabilní anginy pectoris a/ nebo asymptomatického srdečního infarktu bez elevace ST úseku na EKG. Velmi nadějnou se jeví schopnost troponinů stratifikovat míru rizika, s nímž pacienti s menšími srdečními poškozeními dostanou akutní infarkt myokardu nebo skončí náhlou koronární smrtí. To má zásadní význam pro racionální indikaci moderních revaskularizačních procesů (srdečních by-passů, balonkové tromboplastiky – PTCA, trombolytické léčby, implementace stentu). Množství troponinu uvolněného do krevní cirkulace dovoluje kvalifikovaně posoudit kvalitu operativních a jiných invazivních kardiokirurgických zásahů. Doporučení definuje požadovanou přesnost měření (6 % pro myoglobin, 10 % pro troponin). Kritický přehled publikovaných prací ukazuje, že tento požadavek je v mnoha případech, zejména u troponinu I, dosud nedosažitelný. Značným problémem, který komplikuje řešení, jsou velmi měkké tole-

ranční limity výrobců diagnostických souprav tolerujících nepřesnost 3–5krát vyšší.

Při diagnóze srdečních chorob doporučení předpokládá používání dvou rozhodovacích limitů při interpretaci výsledků stanovení troponinů. První diskriminuje mezi zdravou populací a subjekty s poškozením myokardu (uvažuje se 97,5 kvantil zdravé populace). Druhý rozhodovací limit je určen ROC analýzou a diskriminuje populace bez AIM a s AIM. Kritický přehled publikovaných prací ukazuje na skutečnost, že tato kritéria nejsou autory důsledně dodržována. Při stanovení myoglobinu se téměř výhradně používá pouze jeden rozhodovací limit.

Nesouměřitelnost výsledků stanovení cTnI je velkým problémem v diagnostice srdečních chorob. Je způsobena rozdílností použitých monoklonálních protilátek, heterogenitou cirkulujícího cTnI tvořeného třemi složkami různé imunoreaktivity a naprostým nedostatkem standardizace. Troponin I v krevní cirkulaci je tvořen podílem volné frakce, binárního komplexu s troponinem C a ternárního komplexu s troponiny C a T. Maximální a minimální udávané hodnoty rozhodovacích limitů se od sebe liší dvacetinásobně. Je velmi překvapující, že dobře definovaná a malá molekula myoglobinu se známými epitopy má proti očekávání poměr extrémů rozhodovacího limitu 2,3.

Celková doba odezvy má být kratší než 1 h. Z toho plyne, že laboratorní odezva musí být kratší než 30 min a vlastní analýza by neměla trvat déle než 15 min. Materiálem volby je plazma. Jako antikoagulans se doporučuje heparinát lithný, protože EDTA může ovlivnit výsledky stanovení cTnI štěpením jeho binárních a ternárních komplexů. Kritický přehled dat ukazuje, že autoři a výrobci věnují rozdílnou pozornost, a že plazma bývá jen málokdy preferována.

Doporučení IFCC počítá i s decentralizovanou analýzou (POCT) v případech, že laboratoř není schopná dodržet požadovanou dobu odezvy, která je považovaná za významnější než přesnost měření.

## 09 EFFECT OF ISCHEMIA AND REPERFUSION ON MYOFIBRILLAR PROTEINS OF RABBIT MYOCARDIUM

PETER KAPLÁN<sup>a</sup>, MILENA MATEJOVIČOVÁ<sup>a</sup>,  
JÁN LEHOTSKÝ<sup>a</sup>, RADOVAN MURÍN<sup>a</sup>,  
and W. FLAMENG<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Mala Hora 4, 036 01 Martin, Slovak Republic, <sup>b</sup>Centre for Experimental Cardiac Surgery and Anaesthesiology, Catholic University Leuven, B-3000 Leuven, Belgium

Myocardial stunning is a phenomenon characterized by reversible contractile dysfunction that persist after reperfusion despite restoration of normal perfusion. A recent hypothesis proposes that stunning is at least partially due to decreased Ca<sup>2+</sup> responsiveness of myofilaments. However, the molecular mechanisms are not yet fully understood<sup>1</sup>. Several studies have demonstrated selective degradation of myofibrillar proteins during ischemia and reperfusion<sup>2,3</sup>. Other studies have, how-

ever, shown negative findings with regard to myofibrillar protein degradation<sup>4</sup> or protein phosphorylation<sup>5</sup>. The aim of the present study was to determine whether myocardial stunning is associated with changes in myofibrillar function and to characterize protein components of contractile apparatus with the emphasis on regulatory protein troponin I (TnI). The preparation used was the isovolumetric Langerdorff-perfused rabbit heart. Normothermic global ischemia of 15 min followed by 10 min of reperfusion caused significant changes in mechanical performances. Developed left ventricular pressure and the left ventricular  $dP/dt$  were decreased to 68 % and 63 % of the preischemic value, respectively. After ischemia or reperfusion myofibrillar proteins were isolated from samples of left ventricle and were used for protein analysis and measurement of  $Mg^{2+}$ -ATPase activity. To determine whether myocardial stunning is associated with breakdown of myofibrillar proteins, myofibrils were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. There were no differences in relative content of myosin heavy chain, protein C, actin, troponin T, tropomyosin, troponin I, myosin light chain 1 and 2 in myofilaments isolated from control and stunned hearts. To study selective proteolysis of troponin I (TnI) immunoblotting analysis using monoclonal anti-TnI antibody TI-1 was performed. Western blots demonstrated the presence of two immunoreactive bands. The 31 kDa band corresponds to the native TnI. A secondary band of lower molecular mass represents only a minor mass fraction of native TnI (less than 4 %) and was observed in samples from stunned as well as control hearts. Similar results were observed using unfractionated tissue homogenates of left ventricles. This suggests that stunning of isolated rabbit myocardium occurs without TnI degradation. Negative findings are in contrast to results obtained on isolated rat hearts<sup>2,3</sup>, however, they are in agreement with those observed after coronary artery occlusions in swine<sup>4</sup>. This may indicate different mechanism of stunning in different animal species. However, we cannot exclude the possibility that our negative findings are due to low TI-1 antibody specificity and sensitivity to detect TnI fragments. Lack of the effect of ischemia and reperfusion on myofilaments is also supported by functional studies. There were no statistically significant changes in maximum  $Ca^{2+}$ -stimulated  $Mg^{2+}$ -ATPase activity ( $V_{max}$ ), apparent half-maximally activating  $Ca^{2+}$  concentration ( $K_{Ca}$ ) and Hill coefficient in ischemic and stunned hearts when compared with control hearts (Table I). These results are in agreement with the data in the literature<sup>6</sup> and suggest that stunning does not result in enzyme damage.

In conclusion, our study indicates that the mechanical dysfunction occurring during reperfusion of isolated rabbit heart is not the result of structural and functional alterations of

contractile proteins. However, further studies are required to clarify whether different mechanisms of stunning or differences in experimental protocols and analytical techniques are the cause of contradictory literature data.

## REFERENCES

1. Bolli R., Marbán E.: *Physiol Rev.* 79, 609 (1999).
2. Gao W. D., Atar D., Liu Y., Perez N. G., Murphy A. M., Marban E.: *Circ. Res.* 80, 393 (1997).
3. Van Eyk J. E., Powers F., Law W., Larue C., Hodges R. S., Solaro R. J.: *Circ. Res.* 82, 261 (1998).
4. Thomas S. A., Fallavollita J. A., Lee T.-C., Feng J., Canty M. M.: *Circ. Res.* 85, 446 (1999).
5. Matejovicova M., Kaplan P., Mubagwa K., Raeymaekers L., Pongo E., Flameng W.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 3189 (1997).
6. Westfall M. W., Solaro R. J.: *Circ. Res.* 70, 302 (1992).

## 10 KVALITA KRVNÝCH ELEMENTOV, OXIDAČNÝ STATUS A ENDOTELOVÉ MARKERY U VYBRANÝCH PACIENTOV S DIABETES MELITUS

JÁN LEHOTSKÝ<sup>a</sup>, ANNA DRGOVÁ<sup>a</sup>,  
RADOVAN MURÍN<sup>a</sup>, MILENA MATEJOVIČOVÁ<sup>a</sup>,  
PETER KAPLÁN<sup>a</sup> a MARIÁN MOKÁN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej biochémie, <sup>b</sup>I. interná klinika, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovenská republika

Diabetes mellitus je spojený so zmenami nielen celkového metabolizmu ale aj poruchami cievneho systému a hemostázy s účinkom na rôzne orgány. Významnú úlohu v tomto procese hrajú abnormality lipidového metabolizmu a nadprodukcia reaktívnych foriem kyslíka ako aj zmeny koncentrácií nízko-molekulových antioxidantov. Toto môže vyvolať zmeny membránových fosfolipidov a následne významne vplyvať na procesy zhlukovanie trombocytov (Tr), prínavosť erytrocytov (Er) a aktiváciu leukocytov a spolu s alteráciami hemostázy viesť k mikro a makrovaskulopatiám<sup>1</sup>. V našej práci sme sledovali u vybraných skupín pacientov s diabetes mellitus typ I (IDDM) a typ II (NIDDM) a u kontrolnej skupiny pacientov: *i*) zloženie a organizáciu fosfolipidov krvných elementov v lipidických extraktach membrán metódou HPTLC; *ii*) analyzovali sme zastúpenie antioxidantných elementov (aktivitu superoxid dismutázy SOD použitím xantín oxidázového systému) a produktov oxidačného stresu: *a*) tiobarbitúrová kyselina reaktívne produkty ako marker lipoperoxidácie a  $Fe^{2+}$  stimulované prooxidačné TBARS produkty spektrofotometricky<sup>2</sup> *b*) hladinu bielkovinových SH skupín použitím s DTNB taktiež spektrofotometricky; *iii*) molekulové markery aktivácie endotelu (von Willebrandov faktor, trombolmodulín) a fibrinolytické parametre (tkanivový aktivátor plazminogénu a inhibitor aktivátora plazminogénu)<sup>3</sup>.

U skupín pacientov s IDDM a NIDDM sme zistili k zmeny celkového obsahu fosfolipidov v Er a Tr. U oboch typov diabētu sme pozorovali vzostup hladín lyzofosfolipidov u oboch typov buniek. Hladiny sfingomyelínov sa znižujú len u Er

Table I

Effect of ischemia and reperfusion on kinetic parameters of myofibrillar  $Mg^{2+}$ -ATPase

	$V_{max}$ [nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> ]	$K_{Ca}$ [mmol.l <sup>-1</sup> ]	Hill coefficient
Control	193±9	0.35±0.07	1.9±0.2
Ischemia	229±19	0.39±0.11	1.8±0.2
Stunning	232±23	0.37±0.04	1.6±0.2



v type IDDM, v Tr je ich hladina znížená u oboch typov diabetu. U oboch typov diabetu sme pozorovali v Er zvýšenie hladín fosfatidylinozitolov.

Hladiny lipoperoxidačných produktov sú zvýšené v plazme u IDDM pričom *in vitro* prooxidačná aktivita klesá s hladinami týchto produktov. U NIDDM množstvo voľných SH skupín v Er ako aj v plazme výrazne klesá. Superoxid dismutáza v leukocytovej frakcii vykazuje výraznejší pokles u IDDM. U oboch typov sme nepozorovali zmeny v hladinách kyseliny močovej.

Marker aktivácie endotelu trombomodulín výraznejšie narastá u typu NIDDM. Hladiny PA –I sa zvyšujú najmä u typu IDDM.

Zloženie a oxidačný stav membrán korelujú s patologickým stavom pacientov. Naše výsledky diskutujeme s ohľadom na možné ovplyvnenie antioxidantného stavu podávaním antioxidantov per os v kombinácii s klasickou liečbou.

*Práca bola podporená fakultným grantom JLF UK č. 18/20.*

## LITERATÚRA

1. Taylor R., Agius L.: *Biochem. J.* 250, 625 (1988).
2. Koziková M., Regendová M., Brechtlová M., Líška B.: *Chem. Papers* 52, (Focus Issue), 531 (1998).
3. Galajda P., Martinka E., Mokáň M., Kubisz P.: *Tromb. Res.* 85, 63 (1997).

## 11 PLASMA MAGNESIUM LEVELS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

ALENA VIKTORÍNOVÁ<sup>a</sup> and EVA TOŠEROVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry and* <sup>b</sup>*Department of Internal Medicine I, Faculty of Medicine Comenius University, Bratislava, Slovakia*

Magnesium is an essential component of many enzymes in the body and also involved in glucose homeostasis. Present data suggest that patients with diabetes mellitus tend to a low circulating magnesium level<sup>1-3</sup>. Reduced plasma magnesium levels have been reported in type 2 diabetes and are associated with insulin resistance and diabetic late complications<sup>4,5</sup>.

The aim of present study was to evaluate plasma magnesium levels in patients with type 2 diabetes treated with insulin and oral hypoglycaemic agents (OHA), and to compare the results with those in healthy subjects.

Twenty seven patients with type 2 diabetes included in the study were matched for age, sex and duration of diabetes. 13 patients were treated with insulin (6 males, 7 females, age 53.5±14.0 years, diabetes duration 10.5±8.1 years). 14 patients were treated with OHA (8 males, 6 females, age 61.7±16.1 years, diabetes duration 11.0±7.2 years). No other drugs were taken which are known to interfere with magnesium metabolism. The metabolic control of the diabetes was assessed by analysis of glycated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in blood. The control group consisted of 30 healthy volunteers (16 males, 14 females, age 30.1±12.2 years). Blood samples were taken in the morning after overnight fasting for at least 12 hours. Plasma

magnesium levels were measured by atomic absorption spectrophotometry. Statistical analyses were performed using Student's t test and the data are expressed as means ±SEM. Significance was assumed when p<0.05.

Baseline characteristic of the patients with type 2 diabetes and control subjects are shown in Table I. Plasma magnesium levels were significantly reduced in both the insulin-treated group (0.72±0.012 mmol.l<sup>-1</sup> vs 0.93±0.014 mmol.l<sup>-1</sup>, p<0.0001) and the group treated with OHA (0.81±0.017 mmol.l<sup>-1</sup> vs 0.93±0.014 mmol.l<sup>-1</sup>, p<0.001) compared to control group. Patients with OHA treatment had significantly higher levels of magnesium in plasma (p<0.05) as compared with those in the insulin – treated group. All patients were in good metabolic control (HbA<sub>1c</sub> 8.25±0.23 % and 8.1±0.25 %) to exclude an additional magnesium loss through urinary excretion. No significant correlation between HbA<sub>1c</sub> and plasma magnesium levels were found in both the insulin-treated group and group with OHA treatment.

Reduced plasma magnesium levels are common finding in patients with diabetes mellitus. A relationship between hypomagnesaemia and diabetic late complications have been reported in several studies<sup>1-5</sup>, although the mechanism is still unknown. The main finding of our study are significantly decreased levels of plasma magnesium in patients with type 2 diabetes and hypomagnesaemia which is not correlated to metabolic control (Table I). We found significantly higher levels of magnesium in patients with OHA treatment compared with insulin-treated group. The present results in this study suggest that hypomagnesaemia might represent an important risk factor for the development of diabetic late complications in these patients.

Table I

Baseline characteristic and plasma magnesium levels in patients with type 2 diabetes and control subjects

	Control group	Insulin treatment	OHA treatment
n	30	13	14
Sex [M/F]	16/14	6/7	8/6
Age [years]	30.1±12.2	53.5±14.0	61.7±16.1
Diabetes duration [years]	–	10.5±8.1	11.0±7.2
Plasma magnesium [mmol.l <sup>-1</sup> ]	0.93±0.014	0.72±0.012 <sup>a</sup>	0.81±0.017 <sup>b,c</sup>

Data are given as a mean ±SEM, n is number of subjects per group; <sup>a</sup> p<0.0001 vs control group, <sup>b</sup> p<0.05 vs insulin – treated group, <sup>c</sup> p<0.001 vs control group

## REFERENCES

1. Sjogren A., Floren Ch., Nilson A.: *Acta Med. Scand.* 224, 461 (1988).
2. Schnack Ch., Bauer I., Pregant P., Hopmeier P.: *Diabetologia* 35, 77 (1992).
3. Resnick L. M., Altura B. T., Gupta K. R., Laragh J. H.: *Diabetologia* 36, 767 (1993).

4. Eibl N. L., Kopp H. P., Nowak H. R., Schnack Ch., Hopmeier P.: *Diabetes Care* 18, 188 (1995).
5. De Valk H. W., Verhanik R., van Rijn H. J. M., Geerdink R. A.: *Diabetic Med.* 15, 503 (1998).

## 12 NEUROPEPTIDES AS A MODULATION OF IMMUNE FUNCTIONS

BENADIK SMAJDA<sup>b</sup>, PAVOL JALC<sup>a</sup>,  
and PETER KALANIN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4–6,* <sup>b</sup>*Department of Animal Physiology, P. J. Šafárik University, Šrobárova 57, 040 01 Košice, Slovak Republic*

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a linear 28 amino acid polypeptide originally discovered in lung and intestine and also found in tissues including brain, liver, pancreas, smooth muscle and lymphocytes. The molecular weight is 3381. VIP is structurally related to a family of peptides which include PACAP, PHI, secretin and glucagon. The carboxyterminal amino acid of VIP (Asn) is amidated. VIP has a diverse range of biological actions including vasodilation, electrolyte secretion, neurotransmission and modulation of immune function. VIP is a neuropeptide which interacts with cells of the immune system. VIP can interact directly with lymphocytes and accessory cells, resulting in most cases, but not always in cAMP generation within these cells, and a subsequent cascade of intracellular events that alter effector cell function. VIP appears to modulate maturation of specific populations of effector cells, T cell recognition, antibody production, and homing capabilities. These effects of VIP are tissue-specific and are probably dependent on the resident cell populations within the lymphoid tissue and the surrounding microenvironment. Different microenvironments within the same lymphoid tissue may influence the modulatory role of VIP also. Effects of VIP on immune function may result from indirect effects on secretory cells, endothelial cells, and smooth muscle cells in blood vessels, ducts, and respiratory airways. Influences of VIP on immune function also may vary depending on the presence of other signal molecules, such that VIP alone will have no effect on a target cell by itself, but may greatly potentiate or inhibit the effects of other hormones, transmitters, or cytokines. The activational state of target cells may influence VIP receptor expression in these cells, and therefore, may determine whether VIP can influence target cell activity. VIP contained in neural compartments is involved in the pathophysiology of several disease states in the gut and lung. Release of inflammatory mediators by cells of the immune system may destroy VIP-containing nerves in inflammatory bowel disease and in asthma. Loss of VIPergic nerves in these disease states appears to further exacerbate the inflammatory response. Altered VIP concentration can have significant consequences in terms of health and disease. In addition, the protective effects of VIP from tissue damage associated with inflammatory processes also may be applicable to other pathological conditions such as rheumatoid arthritis, anaphylaxis, and the swelling and edema seen in the brain following head trauma. While VIP degrades rapidly, synthetic VIP-like drugs may be developed that interact with VIP receptors and have

similar protective effects. Synthetic VIP-like agents also may be useful in treating neuroendocrine disorders associated with dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and pituitary release of prolactin.

All this evidence indicates that VIP is an endogenous autocrine modulator of immune function.

*This work is supported by grant of the Ministry of Education VEGA 1/6025/99.*

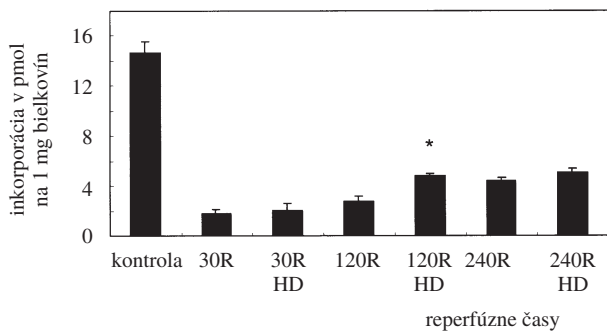
## 13 SLEDOVANIE ZMIEN SYNTÉZY PROTEÍNOV A EXPRESIE c-Fos PROTEÍNU V NUCLEUS CAUDATUS MOZGU POTKANA PO ISCHÉMII A NÁSLEDNEJ REPERFÚZII V ZÁVISLOSTI NA POUŽITÍ HEMODILÚCIE

MIROSLAVA NÉMETHOVÁ, JOZEF BURDA  
a JOZEF MARŠALA

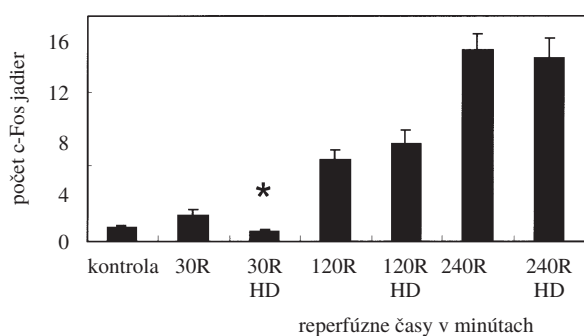
*Neurobiologický ústav SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovenská republika*

Inhibícia syntézy proteínov po ischémii a následnej reperfúzii je spôsobená, ako je už dlhší čas známe, fosforyláciou  $\alpha$ -podjednotky iniciačného faktora eIF-2 (cit.<sup>1</sup>). Podjednotka  $\alpha$  iniciačného faktora eIF-2 po fosforylácii nie je schopná recyklácie, a tým dochádza k zastaveniu procesu iniciácie proteosyntézy v poškodených bunkách. Cerebrálna ischémia tiež vedie k tvorbe tzv. skorých génov a ich produktov. Inhibícia proteosyntézy môže zvyšovať expresiu včasných génov, pretože niektoré skoré produkty včasných génov zabezpečujú represiu ich vlastných transkriptov<sup>2</sup>. Technikou hybridizácie *in situ* bolo dokázané, že zvýšenie produkcie špecifických mRNA pre skoré gény bolo detekované predovšetkým v regiónoch mozgu, ktoré sú známe svojou vysokou citlivosťou na ischémiu, ako sú tzv. selektívne vulnerabilné oblasti – hipokampus a striatum (nucleus caudatus)<sup>3</sup>. Hemodilúcia je efektívny spôsob ako navodiť v ischemicky poškodenom mozgu zvýšenie perfúzie. Zriedením obsahu cirkulujúcej krvi substitučným roztokom je možné dosiahnuť zníženie počtu krvných elementov, ako polymorfonukleárných leukocytov a erytrocytov, ktoré sú hlavným zdrojom voľných radikálov kyslíka, a tým aj zníženie vplyvu radikálov na poškodenie proteosyntetického aparátu.

V našej práci sme sledovali funkčný stav proteosyntetického aparátu v nucleus caudatus prostredníctvom inkorporácie značeného leucínu do polypeptidových reťazcov *in vitro* v bezbunečnom systéme z postschemických mozgov potkanov a zároveň sme sledovali imunohistochemicky expresiu protoonkogénového produktu c-Fos, ako markera ischemického poškodenia. Pokusné zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín, pričom jednej skupine bola navodená experimentálna cerebrálna ischémia bez hemodilúcie a druhej s hemodilúciou. Inkorporáciu značeného leucínu (obr. 1) a expresiu c-Fos proteínu sme stanovovali po troch rozličných časoch reperfúzie – 30 minútach, 120 minútach a 240 minútach, pričom dĺžka ischemického inzultu bola pri všetkých pokusných zvieratách rovnaká – 30 minút. Ischémia bola navodená štandardným modelom štvorcievneho podväzu podľa Pulsinelliho a Brierlyho<sup>4</sup>. Hemodilúcia predstavovala odobratie dva krát po 2 ml



Obr. 1. Hodnoty inkorporácie značeného leucínu do polypeptidových reťazcov *in vitro* v bezbunecnom systéme, prepočítané na množstvo v pmol na 1 mg bielkovín, nucleus caudatus mozgu potkana, po rôznych časoch reperfúzie a použití hemodilúcie; \* predstavuje štatisticky významné hodnoty na úrovni  $p < 0,05$



Obr. 2. Počet pozitívnych c-Fos jadier neurónov v nucleus caudatus mozgu potkana po rôznych časoch reperfúzie a použití hemodilúcie; \* vid' obr. 1

krvi a jej súčasne nahradenie roztokom hydroxyetylškrobu (10 % HES 200/0,5), v 5 minútových intervaloch počas ischemie, až pokiaľ nebol dosiahnutý pokles hodnôt hematokritu na približne 30 %. Po uplynutí zvolených časov reperfúzie boli potkany utratené a mozgy, určené na biochemickú analýzu, boli ihneď po vybratí spracované podľa Burda a spol.<sup>1</sup> Potkany, určené na imunohistochemickú analýzu boli po reperfúzii intrakardiálne perfundované fixačným roztokom (4 % paraformaldehyd) a zmrazené transverzálne rezy mozgov o hrúbke 40  $\mu\text{m}$  boli inkubované imunohistochemickou metódou pomocou avidín-biotín peroxidázového komplexu. Pozitívne c-Fos jadrá buniek boli hodnotené použitím camera lucida. Pre analýzu c-Fos positivity bolo vybratých 10 rezov (300 $\times$ 400  $\mu\text{m}$ ) z dorzo-laterálnej oblasti nucleus caudatus a hodnoty sú vyjadrené ich priemerom (obr. 2).

Z nameraných hodnôt je zrejmé, že 30 minútová ischemia má výrazný inhibičný účinok na aktivitu proteosyntetického aparátu. S predlžujúcim sa časom reperfúzie sa množstvo inkorporovaného značeného prekurzora zvyšuje a štatisticky významné zmeny boli zaznamenané po 2 hodinách reperfúzie. V prípade expície skorých produktov včasných génov c-Fos, štatisticky najviac ovplyvnila hemodilúcia 30 minútové prežívanie, kde sa signifikantne znižuje počet pozitívnych c-Fos jadier oproti reperfúzii bez použitia hemodilúcie. Čo sa však

týka dlhšieho prežívania, nemôžeme konštatovať, že hemodilúcia má priaznivý vplyv na znižovanie expície c-Fos proteínu v bunkách nucleus caudatus mozgu potkana.

Práca bola vypracovaná s podporou grantov VEGA 2/7231/20 a 2/5196/98.

#### LITERATÚRA

1. Burda J., et al.: *Biochem. J.* 302, 335 (1994).
2. Morgan J. I., Curran T.: *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421 (1991).
3. Wessel T. C., et al.: *Brain Res.* 567, 231 (1991).
4. Pulsinelli W. A., Brierly J.: *Stroke* 10, 256 (1979).

#### 14 DISTRIBUTION PATTERNS OF NADPHd-EXHIBITING AND NOS-IR NEURONS IN THE LUMBOSACRAL SEGMENTS IN THE EARLY PHASE OF CAUDA EQUINA SYNDROME IN THE DOG – A HISTOCHEMICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY

JOZEF MARŠALA<sup>a</sup>, DÁŠA ČÍŽKOVÁ<sup>a</sup>,  
JOZEF KAFKA<sup>b</sup>, and IGOR ŠULLA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, <sup>b</sup>Department of Neurosurgery, Medical Faculty of P. J. Šafárik University, Tr. SNP 1, 040 11 Košice, Slovak Republic

Pathogenesis of cauda equina syndrome (CES) and accompanying disorders such as low-back pain, saddle anesthesia, bilateral sciatica, bladder dysfunction, motor weakness of the lower extremities or chronic paraplegia are not fully understood. At present, little information is available concerning the direct effects of cauda equina chronic stimulation or damage on spinal cord neuronal pools and circuitry. Therefore, a model of canine multiple protracted cauda equina constrictions (MPCEC), mimicking the long-term cauda equina compression in human was tested with the aim of analyzing the potential changes in the lumbosacral spinal cord neurons and circuitry in relation to the early phase of CEC, and time course of changes of NADPHd-exhibiting and NOS-IR neurons.

Experiments were performed on 6 adult mongrel dogs, weighing between 11 and 18 kg. Lumbar laminectomy with removal of the sixth and seventh laminae was carried out for gaining access to the cauda equina. The constrictions were made according to our previously described approach<sup>1</sup>. Basically, the animals were divided into two groups, one ( $n = 3$ ), surviving two days postoperatively, and the next one ( $n = 3$ ), surviving 5 days postconstriction. All animals were processed according to previously published protocols<sup>2,3</sup>. All lumbosacral segments were used for histochemical and immunocytochemical analyses, described in detail in our previous papers<sup>3-7</sup>.

In animals, surviving after MPCEC two days constriction multiple NADPHd-positive and NOS-IR neurons were found in the superficial dorsal horn as well as in the deep dorsal horn layers. At this postconstriction time no differences in the

number of NADPHd positive and NOS-IR neurons known from normal material<sup>2</sup> could be detected. Longer postconstriction time considerably broadened the extent of the spinal cord laminae containing NADPHd positive and NOS-IR neurons, comprising not only the intermediate zone of the sacral segments but reaching more ventrally with many reacting neurons in the medial portion of the ventral horns and pericentral gray. While many small interneurons located in the central portion of the ventral horns were clearly affected no signs of NADPHd positivity or NOS-IR staining could be seen in the motoneuronal pools of the lower lumbar and all sacral segments. It is concluded therefore, that during the acute phase of ensuing cauda equina syndrome serving as an model of viscerosomatic pain mainly intrinsic small interneurons are affected, a phenomenon negatively influencing spinal cord circuitry not only in the superficial dorsal horn but, more considerably the ventral horns and the intermediate zone.

*This work was supported by the VEGA Grant No. 2/7222/20.*

## REFERENCES

1. Maršala J., Šulla I., Jalč P., Orendáčová J.: *Neurosci. Lett.* 193, 97 (1995).
2. Lukáčová N., Čížková D., Maršala M., Jalč P., Maršala J.: *Neuroscience* 94, 229 (1999).
3. Orendáčová J., Maršala M., Šulla I., Kafka J., Jalč P., Čížková D., Taira Y., Maršala J.: *Neuroscience* 95, 543 (2000).
4. Maršala J., Kluchová D., Maršala M.: *Expl. Neurol.* 145, 165 (1997).
5. Maršala J., Vanický I., Maršala M., Jalč P., Orendáčová J., Taira Y.: *Neuroscience* 85, 847 (1998).
6. Maršala J., Maršala M., Vanický I., Taira Y.: *J. Comp. Neurol.* 406, 263 (1999).
7. Lukáčová N., Pavel J.: *Physiol. Res.* 49, 167 (2000).

## 15 CHANGES IN CALCIUM HOMEOSTASIS AND CYTOSKELETON ORGANIZATION IN BLOOD ELEMENTS OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE

ANNA STRUNECKÁ<sup>a</sup>, DANIELA ŘÍPOVÁ<sup>b</sup>,  
VERONIKA PLATILOVÁ<sup>b</sup>, VÍT JUŘEK<sup>a</sup>,  
and ROMAN JIRÁK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology and Developmental Biology, Charles University Prague, Faculty of Sciences, Viničná 7, 128 00 Prague 2, <sup>b</sup>Prague Psychiatric Center, Ústavní 91, 181 03 Prague 8, <sup>c</sup>Psychiatric Clinic of the 1<sup>st</sup> Medical Faculty, Charles University, Ke Karlovu 11, 128 00 Prague 2, Czech Republic

Alzheimer's disease (AD) is a major cause of dementia affecting a large aged population. The pathophysiology of AD is connected with the alterations in neurotransmission, amyloid plaques and neurofibrillary tangles formation, and disturbance of calcium homeostasis in brain tissues<sup>1</sup>. Despite the

tremendous effort of clinical and laboratory research, the etiology of this devastating brain deterioration, and an effective and causative therapy is not known. The early and accurate diagnosis of AD remains alike far unachieved goal.

The development of diagnostic criteria is urgently needed. The biochemical approach is based on the hypothesis that the causative disorder of AD may lurk at the level of cell physiology, altering various brain functions, such as the recognition, memory, language and visuospatial skills. Documentation of a change in the peripheral cells could help in the search for biological markers for diagnosis, understanding the pathophysiology of AD, and for the search for new therapeutic strategies. The identification of a biological peripheral marker would also to determine whether AD is a systemic disease or whether it is limited to the brain. Our working hypothesis suggests that neurodegenerative changes, which occur in the brain of patients with AD, may manifest in blood elements. Alterations of protein tau reported by many authors enable us to assume changes in the cytoskeletal network in peripheral cells. An alteration in calcium homeostasis could affect most of the AD-related deficiencies.

We used blood platelets and red blood cells to study the changes in free intracellular calcium concentration  $[Ca^{2+}]_i$  and organization of cytoskeletal network in peripheral cells of patients with AD, young and age-matched healthy subjects.  $[Ca^{2+}]_i$  was determined using long wavelength indicator Fluo-3AM as previously described<sup>2</sup>. Organization of spectrin and tubulin was observed by means of specific antibodies using indirect immunofluorescence technique<sup>3</sup>. Our observations document that aging is connected with changes in cytoskeletal proteins spectrin and tubulin.

In platelets of patients with early stages of AD, the basal values of  $[Ca^{2+}]_i$  were significantly lower in comparison with age-matched and young controls. In the presence of 1 mM calcium in the incubation medium the  $[Ca^{2+}]_i$  markedly increased in AD patients while the  $[Ca^{2+}]_i$  increased only to a smaller extent in control age-matched and young subjects. The present study proposes that calcium dysregulation during the whole disease period could not be uniform and according to our results the  $[Ca^{2+}]_i$  is reduced in the first stages of AD. We speculate that the disturbed calcium homeostasis in AD is an "early defect".

Our study further suggests the systemic feature of this disease and support the view that examining peripheral cells may represent a useful approach to explore the cellular pathophysiology of AD.

*Supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Grant No. NG/15-3) and by the Grant of Charles University Prague (No. 113/1998/BBio/PřF).*

## REFERENCES

1. Strunecká A., Řípková D.: *Č. S. Psychiat.* 9, 245 (1997).
2. Řípková D., Strunecká A., Platilová V., Höschl C.: *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 6, 125 (1999).
3. Paleček J., Pěkníková J., Vítů M.: *Folia Biol.* 45, 13 (1999).



## 16 EFFECT OF ISCHEMIC TOLERANCE ON THE INHIBITION OF TRANSLATION INDUCED BY ISCHEMIA AND SUBSEQUENT REPERFUSION IN THE RAT BRAIN

JOZEF BURDA<sup>a</sup>, MIROSLAVA NÉMETHOVÁ<sup>a</sup>, CRISTINA MARTIN DE LA VEGA<sup>b</sup>, ELENA MARTÍN<sup>b</sup>, VIERA DANIELISOVÁ<sup>a</sup>, MIROSLAV GOTTLIEB<sup>a</sup>, JUAN L. FANDO<sup>c</sup>, and MATILDE SALINAS<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovakia,* <sup>b</sup>*Hospital Ramón y Cajal, Servicio de Bioquímica, Ctra Colmenar 9, 28034 Madrid, España,* <sup>c</sup>*Universidad de Alcalá, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 28871 Alcalá de Henares, España*

Although, ischemia per se produces relatively moderate changes which are dependent on the model and duration of the ischemia and intraschemic temperature, generates background for profound protein synthesis alterations occurring during subsequent reperfusion. First minutes of postischemic reperfusion are characterised by nearly complete block of translation, focused to the inhibition of initiation, which is manifested by disaggregation of polyribosomes to monosomes and ribosomal subunits. After common transient inhibition of initiation, most brain regions recover their protein synthesis capability; however, inhibition in the selectively vulnerable regions is persistent. Deep inhibition of translation occurring immediately after the blood flow restoration to ischemic brain tissue is caused by the phosphorylation of  $\alpha$  subunit (38 kDa) of initiation factor 2 (eIF-2)<sup>1</sup>. The results of Kato<sup>2</sup> and Furuta<sup>3</sup> based on autoradiography and electron microscopy show that the ischemic tolerance (IT) is closely related to the facilitated recovery from suppressed protein synthesis in the brain after ischemia. Most of the tolerance-induced neurons demonstrated reaggregation of cytosomal ribosomes and restoration of impaired amino acid incorporation 24 h after the ischemia. These findings suggest that recovery of protein synthesis during the early post ischemic phase is essential for CA1 neuron survival after ischemic injury.

Our presented work was focused to the *in vitro* study of translational changes induced by ischemic tolerance as well as comparison of the influence of various time intervals between preconditioning (sublethal ischemia) and lethal ischemia (four vessel occlusion model of transient forebrain ischemia<sup>4</sup> follo-

wed by short reperfusion. Protocol of the experiment: Control – sham operated rats without ischemia; I30/R30 – test (lethal) ischemia 30 min with subsequent 30 min of reperfusion; IT groups – 4 min of sublethal ischemia followed by 30 min, 2 hours, 4 hours or 2 days of first reperfusion (ischemic tolerance induction) with subsequent test ischemia and reperfusion equal to the group I30/R30.

Results presented in Table I show that while test ischemia I30/R30 inhibits proteosynthetic machinery in all brain regions by 90 %, ischemic tolerance induced by short sublethal ischemia which preceded test ischemia for 30 min only significantly improves translational activity. No differences were observed in comparison between 30 min and 2 hours of IT induction. At the fourth hour of interval between preconditioning and test ischemia the second period of changes inducing tolerance against subsequent lethal ischemia begins. At this time values of leucine incorporation reach 55–75 % of sham control activity. Finally, after two days ischemic tolerance is able to preserve 90 % of proteosynthetic activity.

Mechanism of preservation consists in the improvement of reinitiation ability which is completely broken after test ischemia in non-tolerant animals but gradually increases with duration of interval between preconditioning and test ischemia. Significantly improved is phosphorylation of eIF-2 $\alpha$ , too. While eIF-2 $\alpha$  phosphorylation represents in test ischemia (I30/R30) 28.4 % (cortex) of total eIF-2 $\alpha$  in tolerant animals (IT 2 days) equal ischemic intervention causes in individual regions 8–12 % of eIF-2 $\alpha$  phosphorylation only. Decreased eIF-2 $\alpha$  phosphorylation accompanied by increased reinitiation ability and translational activity suggests two possible mechanisms of ischemic tolerance intervention to the translational machinery: inhibition of specific protein kinases (not increased in test ischemia without IT) or, more probably, activation of eIF-2 $\alpha$  protein phosphatases PP-1 and/or PP-2A transiently decreased after the test ischemia in non-tolerant rats (our unpublished results).

*Supported by grants SK-VEGA 2/7231/20 and 2/5169/98 and ESP-MEC PM97-0071 and FIS 00/0245.*

### REFERENCES

- Burda J., Martin M. E., Garcia A., Alcazar A., Fando J. L., Salinas M.: *Biochem J.* 302, 335 (1994).
- Furuta S., Ohta S., Hatakeyama T., Nakamura K., Sakaki, S.: *Acta Neuropathol.* 86, 329 (1993).

Table I

Incorporation of <sup>3</sup>H-leucine into polypeptides in cell-free system from brain of ischemic rats

Region	Control	I30/R30	IT 30 min	IT 2 h	IT 4 h	IT 2 d
Cortex	16.8±0.5	1.4±0.1 <sup>a</sup>	4.2±0.6 <sup>a,b</sup>	4.0±0.1 <sup>a,b</sup>	10.9±0.6 <sup>a,b</sup>	14.9±1.0 <sup>b</sup>
Hippocampus	19.0±1.1	2.0±0.1 <sup>a</sup>	3.8±0.2 <sup>a,b</sup>	4.5±0.2 <sup>a,b</sup>	10.8±0.2 <sup>a,b</sup>	16.7±1.4 <sup>b</sup>
Striatum	15.3±0.7	1.8±0.4 <sup>a</sup>	3.9±0.1 <sup>a,b</sup>	4.3±0.1 <sup>a,b</sup>	11.5±0.1 <sup>a,b</sup>	16.4±1.4 <sup>b</sup>

Data are expressed as pmol.l<sup>-1</sup> of leucine incorporated into TCA insoluble fraction per 1 mg of protein. Values represent means ±SEM with n = 4 in each group; <sup>a</sup> represents significant differences compared to sham control group (p<0.05), <sup>b</sup> represents significant differences compared to group without IT (p<0.05)

3. Kato H., Kogure K., Nakata N., Araki T., Itoyama Y.: *Brain Res. Bull.* 36, 205 (1995).
4. Pulsinelli W. A., Brierley J.: *Stroke* 10, 256 (1979).

### 17 EFFECTS OF 7-NITROINDAZOLE AND AMINO Guanidine ON NADPH-DIAPHORASE ACTIVITY IN THE RAT ISCHEMIC BRAIN

VIERA DANIELISOVÁ, MIROSLAV GOTTLIEB, and JOZEF BURDA

*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 6, 040 01 Košice, Slovak Republic*

There are three types of NO synthase. Neuronal and inducible NO synthases have a neurotoxic effect and endothelial NO synthase has a protective effect. The increase in NO metabolites showed two peaks in the ischemic brain damage, one during ischemia and the other during the reperfusion period. Preischemic treatment with 7-nitroindazole, a selective neuronal NO synthase inhibitor suppressed both peaks of NO metabolites, whereas preischemic treatment with aminoguanidine, a selective inducible NO synthase inhibitor, partially suppressed only the peak in the reperfusion period<sup>1</sup>. In all three isoforms of NO synthases, the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) activity is found, which has been used to localize NO synthase containing neurons. The presence of NO synthase was inferred by the histochemical demonstration of NADPH-d (Ref.<sup>2</sup>).

NADPH-d activity was assayed spectrophotometrically by measuring the reduction of nitroblue tetrazolium (0.5 mM) in the presence NADPH (1 mM) (Ref.<sup>3</sup>). We report changes in NADPH-d activity after transient forebrain ischemia (4-vessels occlusion)<sup>4</sup> and 7 days reperfusion in the rat and these changes were compared with the same ischemia without pre-treatment and with the sham-operated control. After ischemia without pre-treatment, a significant two-fold increase in NADPH-diaphorase activity was found in all the areas that were investigated (neocortex, hippocampus). A systemic administration of 7-nitroindazole (25 mg.kg<sup>-1</sup> b.w. i.p.) 30 min before ischemia, NADPH-diaphorase activity in the neocortex was preserved at the control level only during 3 hours after reperfusion. After 3–7 days of reperfusion the activity was significantly increased (by 25 %) in comparison with the control sham-operated group. The administration of aminoguanidine (100 mg.kg<sup>-1</sup> b.w. i.p.) 30 min before ischemia blocked the increase of NADPH-d activity after ischemia at the control level during 3 hours reperfusion and then significantly decreased by 30 % below the control level after 3 and 7 days reperfusion (Fig. 1).

In the hippocampus, the NADPH-d activity was significantly increased after ischemia and reperfusion. After pre-treatment with a specific neuronal NO synthase inhibitor 7-nitroindazole, the NADPH-d activity was non significantly increased by 20 % in comparison with the control level during short time of reperfusion. However, after 3–7 days reperfusion enzyme activity was increased by 40 % in comparison with

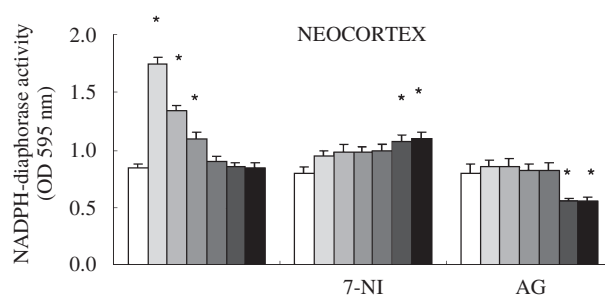


Fig. 1. The effect of 7-nitroindazole (7-NI) and aminoguanidine (AG) on NADPH-diaphorase activity in the neocortex after 30 min ischemia and reperfusion. Data are expressed as the mean  $\pm$ SEM and are normalized to 100  $\mu$ g protein; n = 6 each performed in triplicate; p<0.05 compared with control (ANOVA)

□ control, □ ischemia 30 min., □ isch.+rec. 30 min., □ isch.+rec. 1 h, ■ isch.+rec. 3h, ■ isch.+rec. 3d, ■ isch.+rec. 7d

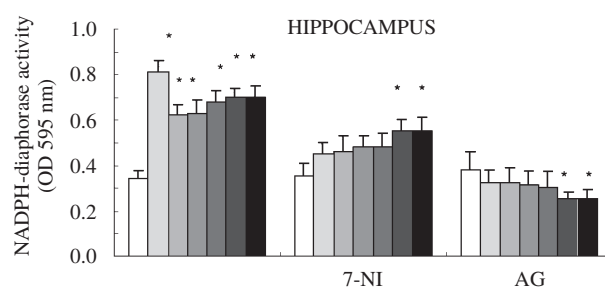


Fig. 2. The effect of 7-nitroindazole (7-NI) and aminoguanidine (AG) on NADPH-diaphorase activity in the hippocampus after 30 min ischemia and reperfusion. Data are expressed as the mean  $\pm$ SEM and are normalized to 100  $\mu$ g protein; n = 6 each performed in triplicate; p<0.05 compared with control (ANOVA)

the sham-operated control group. The dynamic of the changes in NADPH-d activity after the pre-treatment with aminoguanidine in the hippocampus was comparable with that found in the neocortex (Fig. 2).

7-Nitroindazole and aminoguanidine suppressed the increase of NO metabolites, but in different ways. 7-Nitroindazole suppressed the initial increase in NO by its direct inhibition of neuronal NO synthase in the early phase of cerebral ischemia, but aminoguanidine directly suppressed inducible NO synthase activity in later phase of cerebral ischemia. The results suggest that NADPH-d is probably identical to NO synthase.

*This work supported by the Vega Grant No. 2/7231/2000 and 2/5169/98.*

#### REFERENCES

1. Higuchi Y., Hattori H., Kume T., Tsuji M., Furusho: *Eur. J. Pharmacol.* 342, 47 (1998).
2. Vincent S. R., Kimura H.: *Neuroscience* 46, 755 (1992).
3. Kounen D. R., Kemp M. C., Roberts P. J.: *J. Neurochem.* 50, 1017 (1988).
4. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: *Stroke* 10, 267 (1979).

## 18 IRON DEPOSITION IN THE RAT ISCHEMIC BRAIN

VIERA DANIELISOVÁ, MIROSLAV GOTTLIEB,  
and JOZEF BURDA

*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 6, 040 01 Košice, Slovak Republic*

Iron in various organs is involved in the formation of free radicals, thus contributing to lipid peroxidation. It has been showed that recirculation of blood after transient cerebral ischemia causes an increase in low molecular weight species of iron and that free radical formation initiated by iron ions leads to brain damage by lipid peroxidation during early stages of cerebral ischemia<sup>1</sup>. To elucidate iron-related pathology in the brain during chronic phase ischemia, we investigated histochemically distribution of iron at 1–8 weeks after transient forebrain ischemia produced using the four-vessel occlusion model<sup>2</sup> in rat brain. Brain iron was determined by Perls reaction with 3,3-diaminobenzidine (DAB) intensification<sup>3</sup>.

In the hippocampus CA<sub>1</sub> area, which is the region most vulnerable to ischemia, iron began to accumulate by 3 weeks after recirculation. Positive staining by Perls' DAB reaction appeared in the hippocampus CA<sub>1</sub> region by 4 weeks after recirculation and reached maximal levels by 8 weeks. The staining was greater in the hippocampal CA<sub>1</sub> region than in the frontal cortex. Iron accumulation in the hippocampal CA<sub>1</sub> region indicating that iron deposition was probably produced in the process of gliosis. Iron was occasionally present in the fine granular deposits in the perikarya and neuronal processes of some pyramidal neurons in layer V of the frontal cortex. At 4 and 8 weeks after recirculation in the ischemic group, the granular iron-laden pyramidal neurons of the frontocortical layer V showed an increase with time and were significantly more numerous than in sham-operated controls. The granular iron deposition in pyramidal neurons of cerebral cortex was not accompanied by any glial reaction in the chronic stage of ischemia (Fig. 1).

Regardless of the sources or mechanisms, deposited iron may lead to lipid peroxidation in neurons and consequent

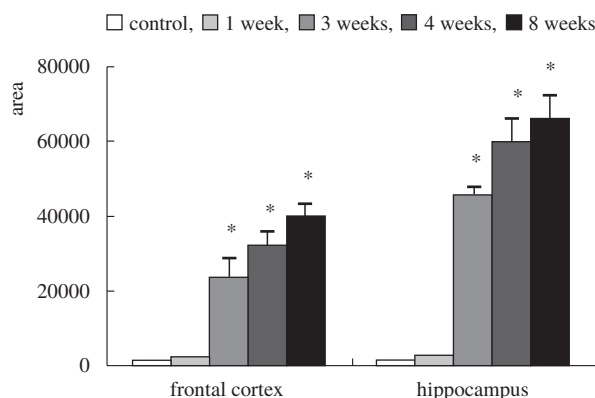


Fig. 1. Regional differences in iron deposition from 1 to 8 weeks after 30 min transient forebrain ischemia in the frontal cortex and hippocampus. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for area ( $\mu\text{m}^2$ );  $n = 6$  each;  $p < 0.05$  compared with sham-operated control group (ANOVA)

slowly progressive neuronal dysfunction. An iron imbalance has been found as part of the pathophysiology or pathogenesis of a number of neurodegenerative disorders, including Alzheimer disease and Parkinson disease. Most of work on cerebral ischemia has been focused on the acute stage. It seems possible, however, that the long-term pathological changes accompanied by iron deposition after a transient ischemic insult may be very useful as a new model of chronic neuronal damage.

*This work was supported by the Vega Grant No. 2/7231/2000 and 2/5169/98.*

## REFERENCES

- Rosenthal R. E., Chanderbhan R., Marshall G., Fiskum G.: *Free Radical Biol. Med.* 12, 29 (1992).
- Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: *Stroke* 10, 267 (1979).
- Hill J. M., Switzer R. C.: *Neuroscience* 11, 595 (1984).

## 19 CREATINE KINASE REACTION IN RAT BRAIN DURING CHRONIC ISCHEMIA AND ETHANOL INTOXICATION – <sup>31</sup>P MAGNETIC RESONANCE STUDY

DUŠAN DOBROTA<sup>a</sup>, SVATAVA KAŠPAROVÁ<sup>b</sup>,  
VLADIMÍR MLYNÁRIK<sup>c</sup>, ZUZANA BRAUNOVÁ<sup>c</sup>,  
TIBOR LIPTAJ<sup>b</sup>, TRAN N. PHAM<sup>b</sup>,  
JAROMÍR HORECKÝ<sup>d</sup>, and ANNA GVOZDJÁKOVÁ<sup>e</sup>

*<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Martin, <sup>b</sup>NMR Laboratory, Slovak Technical University, Bratislava, <sup>c</sup>Radiodiagnostic Clinic, Derrer Faculty Hospital, Bratislava, <sup>d</sup>Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava, <sup>e</sup>Pharmacobiochemical Laboratory, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*

The enzyme creatine kinase catalyzes a transfer of the *N*-phosphoryl group from phosphocreatine to ADP to regenerate ATP and plays a key role in the energetic homeostasis of cells with fluctuating energy requirements such as brain cells – neurons. In the <sup>31</sup>P MR spectra in the brain are generally dominated by signals from ATP and PCr which are substrates and products of the creatine kinase reaction. <sup>31</sup>P MRS is ideally suited to study this reaction using of magnetization transfer experiments. This method has been extensively used to study creatine kinase reaction rates in various tissues: in perfused heart<sup>1</sup>, skeletal muscle<sup>2</sup> and in brain<sup>3</sup>. These studies have sought to established the relationship between creatine kinase exchange flux and changes in ATP hydrolysis or oxidative ATP synthesis associated with increased cellular work. Many works seems to indicate that in different tissues, CK flux may respond differently to increased workload or during acute metabolic stress<sup>4</sup>. A clear correlation between CK-catalysed flux and brain activity has been demonstrated *in vivo* by MRS magnetization transfer<sup>3</sup>.

In this work we studied kinetics of the above reaction in adult and aged rat brains under conditions hypoperfusion or during of mild and severe chronic cerebral ischemia and chronic alcoholic intoxication. For the experiments, 6-month

old (250–300 g) and aged, 14–15 month (320–480 g) old Wistar rats were used. They were anaesthetized with 2 % halothane oxygen/air mixture (1:1). Mild (two vessel occlusion) and severe (three vessel occlusion) brain ischemia were induced in mature and also aged rats. Mild chronic cerebral ischemia was induced in rats by ligating both common carotid arteries. Severe chronic cerebral ischemia was modeled in above animals, which was induced by simultaneous ligating the left subclavian artery and occlusion both common carotid arteries. The animals for model of chronic alcoholic intoxication were given 3 ml of 30 % ethanol once daily with gastric tube for the period of 3 weeks. Control animals ( $n = 6$ ) were given 2 ml of water once daily with gastric tube. Phosphorus MR spectroscopy saturation transfer method was performed on an 4.7 T 200/330 SISCO instrument, equipped with a horizontal magnet, at 81 MHz. The static magnetic field was shimmed using proton signal which showed typical line width of 20–35 Hz. We have used time dependent saturation transfer who allows one to measure simultaneously two parameters,  $T_1$  and  $k_{\text{for}}$ . The resonance  $\gamma\text{ATP}$  is saturated for increasing times, the magnetization of phosphocreatine will exponentially decay to a new steady state. Aged rats kept for 9–10 weeks under condition hypoperfusion showed no statistically important changes in conventional  $^{31}\text{P}$  MRS spectrum. However, aged rats 2 weeks after above occlusions showed significant decrease in  $k_{\text{for}}$  ( $0.23 \pm 0.02$ ) $\text{s}^{-1}$  and 9 weeks after surgery  $k_{\text{for}}$  decreased on the value ( $0.20 \pm 0.03$ ) $\text{s}^{-1}$ . These data suggest that the creatine kinase reaction could play a key role in the energetic systems of the aged brain under conditions chronic cerebral ischemia. In comparison with the control group ( $0.30 \pm 0.02$ ) $\text{s}^{-1}$ , the adult rats measured 2 and 9 weeks after 3 vessel occlusions showed no statistically significant changes in  $k_{\text{for}}$  ( $0.28 \pm 0.03$ ) $\text{s}^{-1}$ . This fact probably related to very good adaptability of mature rat brains. In our experiments on aged rats under condition mild chronic cerebral ischemia (two vessel occlusion) showed also significant decrease in the rate constants ( $0.23 \pm 0.02$ ) $\text{s}^{-1}$  2 and 9 weeks after occlusions. The above results indicate that not only model severe but also even mild chronic cerebral ischemia causes changes in forward rate constant  $k_{\text{for}}$  of the creatine kinase reaction. However, measurement of creatine kinase reaction in alcoholic rat brain showed significant decrease of the forward creatine kinase rate constant ( $0.31 \text{ s}^{-1}$ ) compared to controls ( $0.38 \text{ s}^{-1}$ ), which was probably consistent with an inhibition of the activity of the creatine kinase system during the alcohol stress. The decreased activity of creatine kinase already after 3 weeks of ethanol intoxication is unlikely to be a specificity only of this model of ethanol intoxication or of these rats. We think that the decrease in creatine kinase activity is a common feature of our 3 models of chronic ethanol intoxication indicating disorder in energy metabolism in the brain of the alcohol-fed rats.

We concluded that *in vivo* phosphorus magnetization transfer MR spectroscopy methods are a powerful technique for monitoring non-invasively high-energy phosphate turnover. The use these techniques for brain metabolic studies have contributed to a better understanding of the underlying processes of various neurological disorders. It is believed that the described technique can be used to evaluate progressive neuronal damage in the brain under condition chronic ischemia or alcoholic intoxication. It might perhaps serve as a relatively noninvasive *in vivo* biomarker for age-related neurodegenera-

tive diseases, because using this technique it is possibly predict a brain energy metabolism damage which is not yet detectable by conventional magnetic resonance spectroscopy methods.

*This work was supported by the C category grant of the Ministry for Education, Slovak Republic.*

## REFERENCES

1. Joubert F., Hoerter J. A.: Cell. Mol. Biol. 43, 763 (1997).
2. Horska A., Spencer R. G.: Magn. Reson. Med. 36, 233 (1997).
3. Sauter A., Rudin M.: J. Biol. Chem. 682, 13166 (1993).
4. Ingwall J. S., Atkinson D. E., Clarke K., Fettes J. K.: Eur. Heart. J. 11 (Suppl) B, 108 (1990).

## 20 HUMAN ADENYLOSUCCINATE LYASE (ADSL), CLONING AND CHARACTERISATION OF FULL LENGTH cDNA AND ITS ISOFORM, GENE STRUCTURE AND MOLECULAR BASIS FOR ADSL DEFICIENCY IN 6 PATIENTS

STANISLAV KMOCH<sup>a</sup>, HANA HARTMANNOVÁ<sup>a</sup>,  
BLANKA STIBŮRKOVÁ<sup>a</sup>, JAKUB KRIJT<sup>a</sup>,  
MARIE ZIKÁNOVÁ<sup>a</sup>, and IVAN ŠEBESTA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Institute for Inherited Metabolic Disorders and <sup>b</sup>Department of Clinical Biochemistry, Charles University 1st School of Medicine and General Faculty Hospital, 120 00 Prague, Czech Republic

Adenylosuccinate lyase (ADSL) is a bifunctional enzyme acting in purine *de novo* synthesis and purine nucleotide recycling. ADSL deficiency is a selectively neuropathic disorder with psychomotor retardation and epilepsy as leading traits. Both dephosphorylated enzyme substrates, succinylaminoimidazole-carboxamide riboside (SAICAR) and succinyladenosine (S-Ado), accumulate in the cerebrospinal fluid (CSF) of affected individuals with S-Ado/SAICAR concentration ratios proportional to the phenotype severity. We studied the disorder at various levels in a group of six patients with ADSL deficiency. We identified the complete *ADSL* cDNA and its alternatively spliced isoform resulting from exon 12 skipping. Both mRNA isoforms were expressed in all the tissues studied with the non-spliced form 10-fold more abundant. Both cDNA were expressed in *E. coli* and functionally characterised at the protein level. The results showed only the unspliced ADSL to be active. We described for the first time the structure and complete genomic sequence of the *ADSL* gene. The gene consists of 13 exons spanning 23 kb. The promoter region shows typical features of the housekeeping gene. Eight mutations were identified in a group of six patients. The expression studies of the mutant proteins carried out in an attempt to study genotype-phenotype correlation showed that the level of the residual enzyme activity correlates with the severity of the clinical phenotype. All the mutant enzymes studied *in vitro* displayed a proportional decrease in activity against both of their substrates. However, this was not concordant with strikingly different concentration ratios in the CSF of individual patients. This suggests either different *in vivo*



enzyme activities against each of the substrates and/or their different turnover across the CSF-blood barrier which may be decisive in determining the disease severity.

## 21 OXYTOCINOVÉ RECEPTORY V HIPOKAMPU POTKANA PO CHRONICKÉM PODÁVÁNÍ AMFETAMINU

ELŠAN S. NAZAROV<sup>a,b</sup>, PAVEL ŠÍDA<sup>b</sup>,  
JIŘINA SLANINOVÁ<sup>a</sup> a VĚRA KLENEROVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie and biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav farmakologie, 1. Lékařská fakulta UK, 120 00 Praha 2

Oxytocin (OT) i vasopresin jsou uvolňovány do periferie za různých stresových situací a literární data ukazují na rozdílnou sekreci obou hormonů také vlivem návykových látek, jako je např. amfetamin<sup>1</sup>. Psychostimulační látka amfetamin ovlivňuje chování na různých úrovních, což se projevuje změnou lokomoční aktivitou a výskytem stereotypního chování. Po akutním či chronickém podání amfetaminu bylo zjištěno (Morrisovo vodní bludiště)<sup>2</sup>, že dochází k výraznému zhoršení prostorové paměti a orientace u dvou kmenů potkanů. Různé typy stresorů ovlivňují chování podobným způsobem jako amfetamin. Zároveň dochází také k zvýšení hladin OT v plazmě. Vymazání paměťové stopy může být způsobeno OT, a to zejména jeho působením v hipokampu, kam je lokalizováno centrum prostorové paměti.

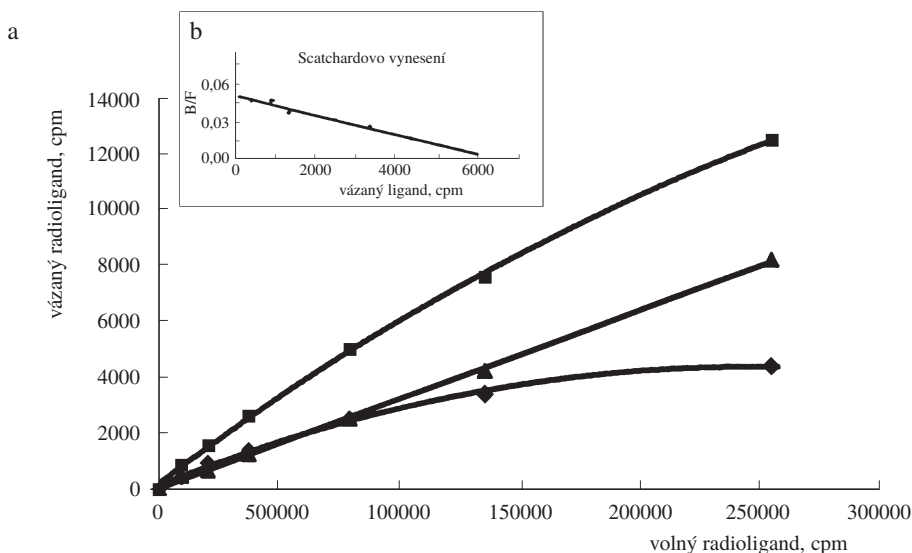
Naším cílem bylo vypracovat metodu pro stanovení množství OT-receptorů na membránách z hipokampu (popř. prefrontálního cortexu nebo striatu) potkanů, a to metodou radioreceptorové analýzy a stanovit  $B_{\max}$  a  $K_d$  v hipokampech zvířat po chronickém podávání amfetaminu. Pokusy jsme prováděli na samcích kmene Wistar (VÚFB, Konárovice, 200–240 g), kteří byli chováni jednak ve speciálním zaříze-

ní pro práci s SPF zvířaty, jednak konvenčně ve zvěřinci ÚOCHB. Zacházení se zvířaty odpovídalo pravidlům Helsinské vyhlášky. Vazbové studie byly prováděny s membránami izolovanými dle Noonana a spol.<sup>3</sup> s mírnými modifikacemi. <sup>125</sup>I-Označený analog OT ([d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, Tyr(Me)<sup>2</sup>, Thr<sup>4</sup>, Orn<sup>8</sup>, Tyr-NH<sup>9</sup>] -vasotocin) o spec. aktivitě 2190 Ci/mmol byl připraven klasickou chloraminovou metodou a čištěním na HPLC (IMMUNOTECH, a.s., Praha). Membrány spolu s radioligan- dem a neznačeným OT nebo antagonistou byly inkubovány 30 min při 37 °C. Vázaná a volná frakce byly odděleny rychlou filtrací (Brandel Cell Harvester, filtr Whatman GF/B). Radioaktivita byla stanovena na  $\gamma$ -počítači Minigamma 1275 (LKB-Wallac, Švédsko). Při použití děložních membrán vykazoval jodovaný preparát publikované hodnoty  $K_d$  a  $B_{\max}$ . Při stanovování OT-receptorů v hipokampu (obr. 1a, b) je problémem vysoká nespecifická vazba (NSB), kterou se nepodařilo snížit žádným způsobem (např. zvýšením koncentrace BSA v pufrch nebo impregnací filtrů ethyleniminem). Vysoké hodnoty NSB při stanovení OT-receptorů na membránách mozku uvádějí i jiní autoři<sup>4</sup>. Po vypracování podmínek bylo stanoveno množství receptorů v hipokampech 6 potkanů, kterým byl aplikován chronicky amfetamin (chrAMF, 8 mg.kg<sup>-1</sup> po dobu 14 dní) a 6 potkanů, kterým byl aplikován fyziologický roztok (kontroly). Byl zjištěn úbytek množství OT-receptorů u potkanů, kterým byl podáván chronicky amfetamin (31,2 fmol.mg<sup>-1</sup> versus 45,8 fmol.mg<sup>-1</sup> u kontrol), rozdíly v  $K_d$  nalezeny nebyly (0,215 mol.l<sup>-1</sup> versus 0,198 nmol.l<sup>-1</sup>). Snížení množství receptorů o přibližně 33 % po chronické aplikaci amfetaminu bychom mohli vysvětlit tak, že dochází k tzv. downregulaci receptorů stálou sekrecí OT z oxytocinergních zakončení vlivem amfetaminu.

Tato práce byla podporována grantem GA ČR 204/99/1435.

## LITERATURA

1. Klenerová V., Šída P., Englišová D., Stohr J., Nazarov E., Kaminský O., Hynie S.: *Physiol. Res.* 48, 513 (1999).



Obr. 1. a – Saturační křivka vazby radioaktivně značeného antagonisty OT na membrány hipokampu, b – Scatchardovo vynesení saturačního pokusu; typický experiment; ■ TB, ▲ NSB, ◆ SB

2. Englišová D., Stohr J., Kaminský O., Šída P., Klenerová V.: *Cesk. Fyziol.* 4, 146 (1999).
3. Noonan L. R., Caldwell J. D., Li L., Walker Ch. H., Pedersen C. A., Mason G. A.: *Dev. Brain Res.* 80, 115 (1994).
4. Caldwell J. D., Walker Ch. H., Pedersen C. A., Barakat A. S., Mason G. A.: *Peptides* 15, 1079 (1994).

## 22 DÔKAZ EXPRESIE GÉNU FENYLETANOLAMÍN-N-METYLTRANSFERÁZY (PNMT) V PREDSEIŇACH A KOMORÁCH SRDCA A JEHO MODULÁCIA IMOBILIZAČNÝM STRESOM

LUCIA MIČUTKOVÁ<sup>a</sup>, MICHAL KOVÁČ<sup>b</sup>,  
JANA JELOKOVÁ<sup>a</sup>, ESTER SABBAN<sup>c</sup>,  
OLGA KRÍŽANOVÁ<sup>b</sup> a RICHARD KVETŇANSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika, <sup>b</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovenská republika, <sup>c</sup>New York Medical College, Valhalla, USA

Potencujúca funkcia katecholamínov pri činnosti srdca je známym fenoménom. Za normálnych podmienok uvoľňuje srdcové tkanivo približne 16× viac noradrenalínu, ako adrenalínu. Požiadavka na obsah adrenalínu rapídne vzrastá v špecifických situáciách (napr. cvičenie, stres, patologické podmienky, starnutie atď.). Fenyletanolamín-*N*-metyltransferáza (PNMT; EC 2.1.1.28) je enzým, ktorý premieňa noradrenalín na adrenalín. Možná expresia génu PNMT v srdci by potenciálne umožňovala vysvetliť niektoré patofyziologické stavy (napr. neopodstatnená tachykardia), kedy je plazmatická hladina katecholamínov v norme, ale srdcový sval je neúmerne excitovaný.

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť možnú expresiu génu fenyletanolamín-*N*-metyltransferázy v srdcových predsieňach a komorách a sledovať, či sa génová expresia tohto enzýmu bude meniť po vystavení organizmu imobilizačnému stresu.

Na stanovenie množstva PNMT mRNA sme použili metódu reverznej transkripcie s následnou polymerázovou reťazovou reakciou (RT-PCR). Génovú expresiu sme vyhodnocovali vzhľadom na tzv. „housekeeper“ glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH), ktorej expresia je pomerne konštantná. Použitím uvedenej metódy sme zistili najvyššie hladiny mRNA pre PNMT v ľavej predsieni srdca (LA). V srdcových komorách (LV, RV) bola hladina mRNA veľmi nízka. Jednorazová dvojhodinová imobilizácia zvýšila génovú expresiu PNMT v predsieňach, v takom istom rozsahu ako imobilizácia opakovaná po dobu 7 dní. V komorách sme podobný efekt nepozorovali. Keďže hladina glukokortikoidov je za stresu veľmi výrazne zvýšená a gén PNMT obsahuje aj glukokortikoidový responsívny element (GRE), zaujímalo nás, či imobilizáciou indukované zmeny hladín mRNA pre PNMT v predsieňach srdca sú regulované glukokortikoidmi. Ukázali sme, že tento efekt je modulovaný glukokortikoidmi, keďže adrenalectómia (odstránenie zdroja glukokortikoidov) kompletne zabránila zvýšeniu hladiny mRNA pre PNMT vyvolanému imobilizáciou.

Zvýšená génová expresia PNMT v predsieňach vplyvom stresu sa potvrdila aj zmenami v aktivite srdcovej PNMT. Hladiny vlastného PNMT proteínu sa nám nepodarilo stanoviť Western blotom a následnou hybridizáciou s polyklonálnou protilátkou proti PNMT, pravdepodobne v dôsledku veľmi malého množstva proteínu a nedostatočnej citlivosti metódy. Hladiny mRNA pre PNMT v srdci však korešpondovali s nameranými hladinami adrenalínu v srdci.

V tejto práci sa prvýkrát identifikovala génová expresia PNMT v srdcových predsieňach a komorách. Expresia génu PNMT bola stimulovaná imobilizačným stresom v srdcových predsieňach, ale nie v komorách. Keďže vyradenie zdroja glukokortikoidov kompletne zablokovalo imobilizáciu indukovaný vzostup hladín PNMT mRNA, dokázali sme, že expresia génu PNMT v srdci je regulovaná predovšetkým glukokortikoidmi.

Táto práca bola podporená grantami VEGA 2/6109 a 2/7158 a grantom FIRCA 1R03TW00984.

## 23 POROVNANIE ÚČINKU VYBRANÝCH STRESOROV NA TYROZÍN-HYDROXYLÁZU U POTKANOV ADAPTOVANÝCH NA CHLAD V DRENI NADOBĽIČIEK A CERVIKÁLNYCH GANGLIÁCH

LUCIA KUBOVČÁKOVÁ<sup>a</sup>, LUCIA MIČUTKOVÁ<sup>a</sup>,  
ESTER SABBAN<sup>c</sup>, OLGA KRÍŽANOVÁ<sup>b</sup>  
a RICHARD KVETŇANSKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, Slovenská republika, <sup>b</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovenská republika, <sup>c</sup>New York Medical College, Valhalla, USA

Imobilizačný stres je považovaný za silný stresový podnet, pretože aktivuje obe časti sympatiko-adrenálneho systému, tj. adrenomedulárnu a sympatoneurálnu. Naše predchádzajúce výsledky ukázali výrazný aktivačný účinok jednorazového imobilizačného stresu na tyrozín-hydroxylázu (TH; EC 1.14.16.2), kľúčový enzým syntézy katecholamínov.

Cieľom tejto štúdie bolo porovnať účinok niektorých stresorov na tyrozín-hydroxylázu v dreni nadobličiek a v cervikálnych gangliách.

Množstvo THmRNA sme stanovovali metódou Northern blotu a následnou hybridizáciou s radioaktívne značenou prípravou pre tyrozín-hydroxylázu. Proteín TH sme zisťovali Western blotom a hybridizáciou s monoklonálnou protilátkou voči tyrozín-hydroxyláze.

V dreni nadobličiek sme na úrovni mRNA nezaznamenali žiadny signifikantný vzostup TH u zvierat, ktoré boli dlhodobo vystavené chladu. Hladiny TH proteínu v dreni nadobličky boli však signifikantne zvýšené u týchto zvierat, v porovnaní s kontrolnými zvieratami. V cervikálnych gangliách sme našli veľmi signifikantný vzostup TH mRNA u zvierat ktoré boli exponované 28 dní na chlad, pričom na úrovni proteínov sme nezaznamenali žiadny signifikantný vzostup TH vplyvom chladu oproti kontrole.

Po dlhodobom vystavení zvierat chladovému podnetu,

niektoré skupiny boli exponované ďalšiemu stresoru, tj. imobilizácií po dobu 2 hod. s následným 3-hodinovým kľudom (IMO), inzulínu (Ins) a 2-deoxyglukóze (2-DG). Tieto skupiny sme porovnávali so skupinami potkanov, ktoré boli vystavené jednotlivým stresorom bez predchádzajúcej adaptácie na chlad. V dreni nadobličky sme pozorovali aditívny účinok imobilizácie, inzulínu a 2-deoxyglukózy k chladovému podnetu na TH mRNA, ale nie na proteín. V cervikálnych gangliách sme našli výrazný nárast TH proteínu u zvierat, ktoré boli adaptované na chlad a následne exponované účinku inzulínu (Ins), alebo 2-deoxyglukózy (2-DG). Tieto výsledky nekorešpondovali s hodnotami mRNA pre TH za rovnakých podmienok.

Záverom možno zhrnúť, že dlhodobý chlad zvyšuje hladiny mRNA pre TH v cervikálnych gangliách, ale nie v dreni nadobličky, zatiaľ čo TH proteín je zvýšený len v dreni nadobličky. Podanie inzulínu a 2-deoxyglukóza výrazne zvyšovali hladiny TH proteínu v gangliách zvierat, ktoré boli adaptované na chlad. Fyziologický význam, ako aj mechanizmus regulácie zvýšenej expresie génu TH za stresu je ešte treba objasniť.

*Táto práca bola podporená grantmi VEGA 2/6109 a FIRCA IR03TW00984.*

## 24 TKÁŇOVÁ TRANSGLUTAMINASA – NOVÝ MARKER CÉLIAKIE U KOMBINOVANÝCH AUTOIMUNITNÝCH ONEMOCNĚNÍ

PETR KOCNA<sup>a</sup>, ZDISLAVA VANÍČKOVÁ<sup>a</sup>,  
JINDRA PERUŠIČOVÁ<sup>b</sup>, MILOŠ DVOŘÁK<sup>c</sup>,  
ZDENKA LÍMANOVÁ<sup>b</sup> a JAN ŠKRHA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie, <sup>b</sup>3. interní klinika, <sup>c</sup>4. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Karlovo n. 32, 121 11, Praha 2

Céliekcie (gluténová enteropathie) patří mezi autoimunitní onemocnění a vyskytuje se proto často u nemocných s jinými autoimunitními onemocněními. K nejčastějším koincidencím patří diabetes mellitus 1. typu (IDDM), autoimunitní thyreoiditis, Sjögrenův syndrom a revmatoidní artritida. U nemocných s céliekcií je asociace s IDDM popsána u 2–7,8 %, recipročně u pacientů s IDDM je popsána ko incidence s céliekcií a to převážně u dětí. U dospělých diabetiků popsal výskyt céliekcie ve 2,6 % Sjöberg na souboru 1664 pacientů s diabetes mellitus 1. typu<sup>1</sup>. Tkáňová transglutaminasa byla identifikována jako hlavní autoantigen antiendomysialních protilátek u nemocných s céliekcií a byl definován možný patogenetický mechanismus. Deamidace gliadinu tkáňovou transglutaminasou vytváří epitop pro vazbu na DQ2 a DQ8, který je rozpoznáván specifickými T-buňkami. Podle studie autorů Bao a spol.<sup>2</sup> je prevalence protilátek ke tkáňové transglutaminase prokázána u 32,3 % HLA DQ2 homozygotních pacientů s IDDM. Na rozdíl od imunofluorescenčního průkazu antiendomysialních protilátek lze protilátky ke tkáňové transglutaminase stanovovat podstatně jednodušší ELISA technikou. K dispozici je již celá řada ELISA souprav, např. firem DPC – Biovendor, Genesis – Dialab, Medipan, Eurospital, Immco. V před-

chozí studii jsme porovnávali soupravy Genesis – Dialab a Medizym s metodikou ověřenou imunologickou laboratoří MBÚ AV ČR ve spolupráci s doc. MUDr. H. Tlaskalovou CSc. a soupravu Genesis – Dialab jsme doporučili pro rutinní diagnostiku.

V této studii jsme se zaměřili na diagnostiku céliekcie v souboru nemocných s jinými autoimunitními onemocněními, především diabetes mellitus 1. typu (IDDM) a autoimunitními chorobami štítné žlázy. Protilátky ke tkáňové transglutaminase (atTG) jsme stanovili ELISA soupravou Genesis – Dialab, antiendomysialní protilátky (EmA) jsme detekovali soupravou Immco – Dialab a anti gliadinové protilátky třídy IgA a IgG (AGA, AGG) vlastním setem s purifikovaným alfa-gliadinem. Protilátky proti thyreoglobulinu (TGAB) a peroxidase štítné žlázy (TMAB, TPO) byly stanoveny setem firmy Dialab. Z celkového počtu vyšetřených vzorků (2146) jsme všechny jmenované markery céliekcie stanovili u 732. Z nich 352 bylo vyšetřováno v souvislosti s endokrinologickou poruchou, nejčastěji diabetem mellitem 1. typu (186), diabetem mellitem 2. typu (26), autoimunitní thyreoiditidou (96) a dalšími thyreopatiemi (20).

Průměrné hodnoty markerů céliekcie atTG (IU.ml<sup>-1</sup>), EmA (% pozitivních), AGA (index) a AGG (index) jsou v jednotlivých sledovaných skupinách následující: céliekcie 32,2; 16,6; 52,7; 66,9; diabetes mellitus 1. typu 14,4; 4,2; 18,4; 30,1; diabetes mellitus 2. typu 11,3; 0; 13,9 a 19,9; autoimunitní onemocnění štítné žlázy 6,15, 1,1, 19,3 a 34,0.

V souboru 75 diabetiků 1. typu jsme prokázali výrazně vyšší hodnoty atTG (18,1 IU.ml<sup>-1</sup>) u skupiny s pozitivitou GAD protilátek ve srovnání se skupinou GAD negativních, kde průměrná hodnota atTG byla pouze 8,45. V souboru 96 thyreopatií jsme prokázali pozitivní hodnoty pro IGA v 15 případech (15,6 %), pro IGG ve 45 případech (46,9 %), pozitivita antiendomysialních protilátek byla nalezena v 1 případě a atTG v 17 případech (17,7 %). Současná pozitivita všech 4 serologických markerů céliekcie byla prokázána v 1 případě (1 %), pozitivita 3 markerů u 5 pacientů (5,2 %) a pozitivita dvou markerů v 17 případech (17,7 %), pozitivita alespoň jednoho markeru v 51 případech (53 %). U 37 pacientů ze skupiny s autoimunitní thyreoiditidou jsme současně stanovili protilátky proti thyreoglobulinu a proti peroxidase štítné žlázy (hodnoty v IU.ml<sup>-1</sup>, normální <100, hraniční 100–250, patologické >250). Skupina pacientů s normálními a hraničními hodnotami TGAB a TMAB se výrazně neodlišovala od skupiny pacientů s hodnotami patologickými při hodnocení protilátek AGG (30,45 resp. 33,1), atTG (5,2 resp. 6,8) a antiendomysialních protilátek. Hodnoty AGA byly ve skupině pacientů s patologickými hodnotami TGAB a TMAB téměř dvakrát vyšší (11,08 resp. 20,25). Ve skupině 18 pacientů s jinými thyreopatiemi (hypothyreosa, struma) jsme našli obdobné průměrné hodnoty AGA a AGG protilátek jako u skupiny pacientů s autoimunitní thyreoiditidou (21,11 resp. 37,42). Průměrná hodnota atTG byla nižší (3,19 IU.ml<sup>-1</sup>) než u pacientů s autoimunitní thyreoiditidou (6,15 IU.ml<sup>-1</sup>).

Analýzou souboru nemocných s hodnotou atTG nad 30 IU.ml<sup>-1</sup> (n = 72), z hlediska jejich primární diagnózy, jsme zjistili kromě 44 céliekcií 12 nemocných s diabetes mellitus 1. typu, 3 nemocné s Crohnovou chorobou a dále nemocné s autoimunitní thyreoiditidou, autoimunitní hemolytickou anémií, revmatoidní artritidou a schizofrenií.

Na základě výsledků této studie lze doporučit rutinní po-

užití ELISA stanovení protilátek ke tkáňové transglutaminase v kombinaci s AGA resp. EmA jako screening céliakie u všech osob s jinými autoimunitními onemocněními.

*Tato studie byla podpořena grantem GA UK 68/1999/C.*

## LITERATURA

1. Sjöberg K., et al.: *J. Intern. Med.* 243, 133 (1998).
2. Bao F., et al.: *J. Autoimmun.* 13, 143 (1999).

## 25 OPRAVA DNA: BIOMARKER PRE CHEMOTERAPIU

KAROL KLEIBL

*Oddelenie molekulárnej genetiky, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská 7, 833 91 Bratislava, Slovenská republika*

Vplyv životného prostredia, rádiácia a chemikálie, hrá dôležitú úlohu pri vzniku nádorov, ktoré sú výsledkom interakcie prostredia a genetickej výbavy jednotlivca. Procesy, ktoré sústavne monitorujú a udržiavajú integritu genetickej informácie sa súborne nazývajú „oprava DNA“ a defekt v špecifických reparačných génoch vedie buď k predispozícii, alebo priamo ku vzniku nádorového ochorenia. Je zjavné, že fenotypická variabilita exprese opravy DNA determinuje citlivosť normálnych a nádorových buniek ku xenobiotickým/genetickým agens, ako sú environmentálne mutagény a protinádorové lieky. Dostupná škála protinádorových terapeutických agens je efektívna iba pre relatívne úzke spektrum nádorov a dokonale objasnenie molekulárnych a bunkových procesov determinujúcich citlivosť, alebo rezistenciu na cytostatikum je predpokladom úspešnej terapie. Kritickým momentom pri výbere vhodného a účinného chemoterapeutika je schopnosť rakovinových buniek opravovať poškodenie DNA a je zjavné, že hladina reparačných enzýmov je v korelácii s rezistenciou cieľových buniek. Nevnímavosť tumorov k chemoterapii môže byť výsledkom koexpresie viacerých enzymatických aktivít a ako potenciálne faktory eliminácie kuratívneho účinku daného cytostatika sa uvádzajú: produkt génu *mdr* (multidrug resistance) P-glykoproteín, detoxifikačné enzýmy a enzýmy opravujúce poškodenia v DNA (cit.<sup>1</sup>).

Alkylačné látky sú účinnou zložkou mnohých protinádorových liekov, ktoré pri predávkovaní majú často vážne vedľajšie efekty (akútna alebo chronická toxicita, myelosupresívny efekt). Podstatou ich letálneho a mutagénneho účinku je alkylácia báz molekúl DNA. Ak takéto poškodenie nebráni komplementárnemu párovaniu báz a neblokuje replikáciu DNA, nie je pre bunku nebezpečné. Tri z týchto poškodení sú pre bunku fatálne: 3-metyladénin a formamido-pyrimidín zabraňujú replikácii DNA a sú z DNA odstraňované špecifickými enzýmami (DNA-glykozylázami), kdežto mutagénny a toxický O<sup>6</sup>-alkylguanín je opravovaný alkyltransferázou (AT-ázou)<sup>2</sup>. Toto sa spoľahlivo potvrdilo v experimentoch s kultúrami cicavčích buniek a na zvieracích modeloch po ich ovplyvnení alkylačnými látkami<sup>3</sup> rutinne používanými v chemoterapii nádorov ako sú: nitrozomočoviny (Carmustine, Lomustine, Fotemustine), metylujúce látky (Dacarbazine, Procarbazine,

Streptozotocin), cyklofosamid, cis-platina, alebo radiomimetické látky (Mitomycin C)<sup>4</sup>.

Z tohto dôvodu je potrebné zaviesť rýchle, citlivé a reprodukovateľné metódy stanovenia aktivít tých enzýmov, ktoré sa zúčastňujú opravy poškodení DNA vyvolaných cytostatikami používanými v klinickej praxi, čo by umožnilo predpokladať reakciu pacienta a následne optimalizovať individuálnu liečbu a sledovať jej priebeh. To by v ďalšom malo smerovať k minimalizovaniu negatívnych bočných vplyvov klinicky neefektívnych vysokoúčinných mutagénov, ktoré vždy znamenajú pre pacienta dlhodobú genetickú záťaž. Na druhej strane by to umožnilo cielene potláčať prirodzenú rezistenciu nádorového tkaniva špecifickými inhibítormi ich reparačnej kapacity, ako sa to už deje v klinickom použití nitrozolúčenín.

V súčasnosti existujú viaceré experimentálne prístupy merania aktivít reparačných enzýmov alkylačných poškodení DNA, z ktorých sú najprepracovanejšie metódy stanovenia AT-ázy. Ide o konvenčnú biochemickú skúšku *in vitro*<sup>5</sup>, stanovenie exprese AT-ázy v extraktach tkanív imunologicky<sup>6</sup>, imunohistochemickú metódu<sup>7</sup>, alebo využitie oligonukleotidov v kombinácii s restriktívnymi enzýmami<sup>8</sup>.

*Táto práca bola podporená grantom VEGA 5033/20.*

## LITERATÚRA

1. Redmond S. M., Joncourt F., Buser K., Ziemiecki A., Altermatt H., Fey M., Margison G., Cerny T.: *Cancer Res.* 51, 2092 (1991).
2. Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., v: *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington D.C., ASM Press 1995.
3. Sakumi K., Shiraishi A., Sekiguchi M.: *Cancer Res.* 57, 2415 (1997).
4. Ferguson L. R., Pearson A. M.: *Mutat. Res.* 355, 1 (1996).
5. Karran P., Lindhal T., Griffin B.: *Nature* 280, 76 (1979).
6. Pegg A. E., Wiest L., Mummert C., Dolan M. E.: *Carcinogenesis* 12, 171 (1991).
7. Brent T. P., von Wronski M. A., Edwards C. C., Bromley M., Margison G., Rafferty J. A., Pegram C. N., Bigner D. D.: *Oncology Res.* 5, 88 (1993).
8. Wu R. S., Hurst-Calderone S., Kohn K. W.: *Cancer Res.* 47, 6229 (1987).

## 26 BASIC BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW MELANOMA MODEL – MINIPIG MeLiM STRAIN

JAN BOROVSANÝ<sup>a</sup>, MILAN ELLEDER<sup>b</sup>, VRATISLAV HORÁK<sup>c</sup>, and NICO P. M. SMIT<sup>d</sup>

<sup>a</sup>2<sup>nd</sup> Department of Medical Biochemistry and <sup>b</sup>Institute of Inherited Metabolic Diseases, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, U nemocnice 5, 128 53 Prague 2, <sup>c</sup>Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, 277 21 Liběchov, <sup>d</sup>Department of Dermatology, Medical Faculty, Leiden University, The Netherlands

Due to many histopathologic similarities with human melanoma (including spontaneous regression and the occurrence



of cryptogenic forms) hereditary minipig melanomas have become preferred melanoma models. Using a partial inbreeding the MeLiM (Melanoma-bearing Liběchov Minipig) strain has been selected in the Institute of Animal Physiology and Genetics in Liběchov<sup>1</sup>. Higher tumour incidence and malignant behaviour make the MeLiM strain better melanoma model compared to other hereditary melanomas in Sinclair miniature swines<sup>2</sup> or in Munich Troll minipigs<sup>3</sup>.

Biochemical uniqueness of melanoma cells is manifested by the expression of tyrosinase and by production of a specific metabolic product – melanin deposited in characteristic subcellular organelles – melanosomes.

Histochemical analysis demonstrated high tyrosinase activities in melanoma cells. Biochemical assays<sup>4</sup> showed  $\alpha$ -mannosidase of lysosomal type and  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) activities in the MeLiM tissue.

Melanin level (determined as described in Ref.<sup>5</sup>) reached  $17.0 \pm 0.2$  weight % in the freeze-dried samples. The oxidation of the MeLiM tissue by means of  $\text{KMnO}_4$  and HI with subsequent HPLC determination of pyrroltricarboxylic acid (PTCA) and 4-amino-3-hydroxyphenylalanine (AHP)<sup>6</sup> revealed that the MeLiM strain is mostly eumelanogenic (AHP/PTCA index<sup>7</sup> = 0.0128). Melanosomes isolated by a sucrose gradient procedure<sup>8</sup> contained  $38.8 \pm 0.3$  % of melanin. Electron microscopy ranked melanosomes to the lamellar group.

The monitoring of tyrosinase<sup>9</sup> and GGT<sup>4</sup> levels in melanoma-bearing minipigs has not so far confirmed a marker value of these enzyme activities.

Conclusions: 1) The MeLiM strain belongs to melanomas with a very high degree of differentiation. 2) The MeLiM melanoma exhibits all the feature enzymes typical of human melanomas; in analogy with the human disease and unlike murine models the marker value of tyrosinase and GGT in sera was not convincing. 3) Melanosomes represent almost half of melanoma dry weight. Hence the processes associated with them may significantly influence behaviour of MeLiM cells. 4) Low concentration of pheomelanin makes the probability of photochemical regression of MeLiM melanoma negligible.

Supported by GA ČR grant 523/98/0229.

## REFERENCES

- Horák V., Fortýn K., Hruban V., Klauďy J.: *Mol. Cell. Biol.* 144, 1119 (1999).

## Tabulka I

Specifická ve skupině B a senzitivita v závislosti na klasifikaci a diferenciaci tumoru

	Cut-off	Specifická [%]	Senzitivita [%]					
			celkem	nádory		GI	GII	GIII
				povrchové	infiltrující			
BTA stat	–	93,3	74,4	69,0	90,0	59,3	74,1	91,7
BTA TRAK	32,3 U.ml <sup>-1</sup>	90,0	67,9	65,5	75,0	48,1	70,4	87,5
UBC Rapid	–	79,3	48,7	44,8	60,0	33,3	51,9	62,5
UBC IRMA	51 mg.l <sup>-1</sup>	90,0	44,9	43,1	50,0	29,6	51,9	54,2
UBC IRMA (kreatinin)	43 mg.l <sup>-1</sup>	90,0	43,6	41,4	50,0	25,9	51,9	54,2
Cytologie	–	100,0	33,3	29,3	45,0	3,7	40,7	58,3

- Misfeldt M. L., Grimm D. R.: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 167 (1994).
- Müller S., Wanke R., Distl O.: *Dtsch. Tierärztl. Wchschr.* 102, 391 (1995).
- Borovanský J., Hach P.: *Mol. Cell. Biol.* 144, 1047 (1999).
- Borovanský J.: *Mikrochim. Acta (Wien)* II, 423 (1978).
- Ito S., Fujita K.: *Anal. Biochem.* 144, 527 (1997).
- Kolb A. M., Lentjes E. G., Smit N. P., Schothorst A., Vermeer B. J., Pavel S.: *Anal. Biochem.* 252, 293 (1997).
- Seiji M., Shimao K., Birbeck M. S. C., Fitzpatrick T. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 100, 497 (1963).
- Vachtenheim J., Pavel S., Duchoň J.: *Neoplasma* 28, 59 (1981).

## 27 SENZITIVITA A SPECIFICKÁ BTA stat, BTA TRAK, UBC Rapid, UBC IRMA A CYTOLOGIE PŘI NEINVAZIVNÍ DETEKCI NÁDORŮ MOČOVÉHO MĚCHÝŘE

MILADA KOŠTÍŘOVÁ<sup>a</sup>, MIRKO BABJUK<sup>b</sup>, KAREL MUDRA<sup>c</sup>, HELENA SMOLOVÁ<sup>b</sup>, EVA SLAVKOVSKÁ<sup>b</sup>, JAROSLAVA CEJNAROVÁ<sup>b</sup>, LADISLAV PECEN<sup>a</sup>, ZIAD IBRAHIM<sup>b</sup>, JAN DVOŘÁČEK<sup>b</sup> a TOMÁŠ ZIMA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie a <sup>b</sup>Urologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice a 1. Lékařské fakulty UK, Praha, <sup>c</sup>Katedra urologie IPVZ, Praha, <sup>d</sup>Oddělení nukleární medicíny, Ústřední vojenská nemocnice, Praha

Základním úkolem při zavádění a následném hodnocení nových metod používaných k neinvazivní detekci nádorů močového měchýře je stanovení jejich senzitivity v závislosti na diferenciaci a rozsahu tumoru, případně specifickosti v různých klinických podmínkách. V naší prospektivní studii byly u dvou markerů – BTA a UBC provedeny a hodnoceny kvalitativní a kvantitativní testy a výsledky srovnány s cytologickým vyšetřením močového měchýře.

Do studie bylo zařazeno 78 pacientů s histologicky ověřeným nádorem močového měchýře (skupina A), 30 pacientů s anamnézou nádoru močového měchýře bez současné recidivy (B), 20 pacientů s jinou urologickou malignitou (C), 38 pacientů s benigním urologickým onemocněním (D), 10 pa-

cientů s prokázanou uroinfekcí (E) a 10 zdravých dobrovolníků (F). K vyšetření byla použita spontánní moč. Kvalitativní testy (BTA stat a UBC Rapid) byly provedeny (bezprostředně) poučenou sestrou a cytologie moči zkušeným cytologem. Kvantitativní testy byly provedeny v různých laboratorických metodikou doporučenou výrobcem: BTA TRAK enzymoimunoanalýzou – EIA a UBC IRMA – analýza imunoradiometrická. Hranici určení pozitivitu kvantitativních testů byla použita hodnota s 90 % specificitou ve skupině B (kontrolní skupina). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách I a II.

Tabulka II

Četnost nesprávně pozitivních výsledků

Skupina	Četnost [%]				Cytologie
	BTA TRAK	UBC IRMA	BTA stat	UBC Rapid	
C	15	30	30	35	0
D	18,4	26,3	3,2	23,7	0

Výsledky BTA stat a BTA TRAK při detekci nádorů močového měchýře jsou signifikantně lepší než výsledky UBC Rapid a UBC IRMA. Všechny testy vykazují vyšší senzitivitu, ale nižší specificitu než cytologie.

## LITERATURA

1. Blumenstein B., Ellis W., et al.: *J. Urol.* 161, 57 (1999).
2. Ellis W. J., Blumenstein B., et al.: *Urology* 50, 882 (1999).
3. Pode D., Shapiro A., et al.: *J. Urol.* 161, 443 (1999).

## 28 THE ROLE OF VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE IN SEXUAL FUNCTION

BENADIK SMAJDA<sup>b</sup>, PAVOL JALC<sup>a</sup>,  
and PETER KALANIN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4–6,* <sup>b</sup>*Department of Animal Physiology, P. J. Šafárik University, Šrobárova 57, 040 01 Košice, Slovak Republic*

Erection is the final common pathway of the integrative synchronized action of psychological, neuronal, hormonal, vascular, and cavernous smooth muscle systems. The penile erectile tissue, specifically the cavernous smooth musculature and the smooth muscles of the arteriolar and arterial walls, plays a key role in the erectile process. In the flaccid state, these muscles are tonically contracted by the sympathetic discharge, and vasoconstrictors secreted by endothelium allowing only a small amount of arterial flow for nutritional purposes. Sexual stimulation triggers release of neurotransmitters from the cavernous nerve terminals. This results in relaxation of these smooth muscles and the following events: 1) dilatation of the arterioles and arteries by increased blood flow in both the diastolic and systolic phases, 2) trapping of

the blood by the expanding sinusoids, 3) compression of the subtunical venular plexuses between the tunica albuginea and the peripheral sinusoids, reducing the venous outflow, 4) stretching of the tunica to its capacity, which encloses the emissary veins between the inner circular and the outer longitudinal layers and further decreases the venous outflow to a minimum, 5) an increase in intracavernous pressure, which raises the penis from the dependent position to the erect state, 6) a further pressure increase with contraction of the ischiocavernosus muscles.

Three phases of detumescence have been reported in an animal study. The first entails a transient intracorporeal pressure increase, indicating the beginning of smooth muscle contraction against a closed venous system. The second phase shows a slow pressure decrease, suggesting a slow reopening of the venous channels with resumption of the basal level of arterial flow. The third phase shows a fast pressure decrease with fully restored venous outflow capacity. Erection thus involves sinusoidal relaxation, arterial dilatation and venous compression.

The principal neurotransmitter involved in penile erection is vasoactive intestinal polypeptide-VIP. Depletion of the VIP may play a key role in the development of impotence.

VIP, a 28 amino acid polypeptide, structurally related to several other vasoactive peptides, is widely distributed in the male and female urogenital tracts as well as the central and peripheral nervous systems. VIP possesses a broad spectrum of biologic actions including modulation of corporal smooth muscle contractility and control of arterial blood inflow for penile erection. VIP induces corporal smooth muscle relaxation by binding to specific VIP smooth muscle membrane receptors, stimulating Gs protein, activating the smooth muscle membrane enzyme adenylate cyclase and elevating intracellular cyclic adenosine monophosphate – cAMP, thereby lowering intracellular calcium.

This review will discuss the role of VIP of erection and vasculogenic erectile dysfunction.

*This work is supported by the grant of the Ministry of Education VEGA No 1/6025/99.*

## 29 PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN A (PAPP-A) IN THE FIRST TRIMESTER

IVAN MATOUŠ-MALBOHAN<sup>a</sup>, LENKA FIALOVÁ<sup>a</sup>,  
LUDMILA MIKULÍKOVÁ<sup>b</sup>, OLGA BENEŠOVÁ<sup>c</sup>,  
KROFTA L.<sup>c</sup>, and ANTONÍN ZWINGER<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*First Institute of Medical Chemistry and Biochemistry,* <sup>b</sup>*Institute for Clinical Chemistry and Biochemistry, First Faculty of Medicine, Charles University,* <sup>c</sup>*Institute for Mother and Child Care, Prague, Czech Republic*

Pregnancy-associated plasma protein A has been reported to be low in Down syndrome affected pregnancies during the first trimester of pregnancy<sup>1-4</sup>. The aim of this study was to determine preliminarily the medians of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester of pregnancy and to compare PAPP-A with other biochemical markers used for biochemical prenatal screening.

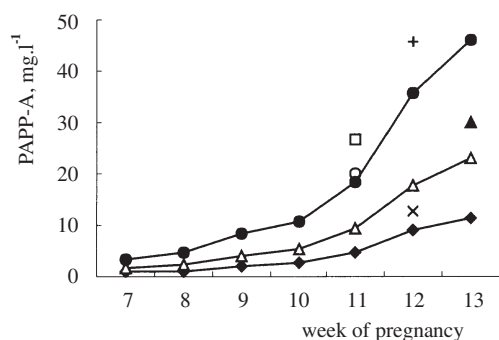


Fig. 1. Serum levels of PAPP-A in the 7<sup>th</sup>–13<sup>th</sup> week of pregnancy, (G1 – G5 – twin pregnancy, MoM – multiple of the median); ◆ 0.5 MoM, △ 1 MoM, ● 2 MoM, ○ G1, ▲ G3, × G4, □ G5

Table I

Correlation coefficients between biochemical markers (n = 141)

Correlation between	Pearson correlation coefficient	p
PAPP-A and MS AFP	0.420	<0.001
PAPP-A and MS HCG	0.019	0.82
PAPP-A and MS SP1	0.541	<0.001

One hundred forty one pregnant women, who undergo biochemical prenatal screening for chromosomal disorders between 7 and 13 week were studied. In addition six women in the second trimester and five women with twin pregnancies, two cases of trisomy 21 and one case of trisomy 18 in second trimester were tested in this study. Maternal serum levels of PAPP-A, human chorionic gonadotrophin (HCG) and alfa-1-fetoprotein (AFP) were measured using ELISA methods. A single radial immunodiffusion was used to determine trophoblast-specific-beta-1-glycoprotein (SP1).

PAPP-A levels increased throughout the first trimester with median 1.6 mg.l<sup>-1</sup> in the 7<sup>th</sup> week to 23.0 mg.l<sup>-1</sup> in the 13<sup>th</sup> week of pregnancy (Fig. 1). The serum levels of 3 women with twin pregnancies were higher than in women with singleton pregnancies. Serum levels of PAPP A in two women with fetus affected by chromosomal disorders did not differ from normal pregnancies. Correlation coefficients between PAPP-A and AFP and between PAPP-A and SP1 were statistically significant ( $r = 0.42$ ,  $p < 0.001$ , respectively  $r = 0.54$ ,  $p < 0.001$ ). The levels of PAPP-A and HCG did not correlate significantly ( $r = 0.019$ ,  $p = 0.82$ ) (Table I).

We established first trimester medians for PAPP-A, which are necessary for evaluation of the pathological values. We found statistically significant correlation between PAPP-A and SP1 and PAPP-A and AFP.

Supported by grants of MZd CR NH/6220-3.

## REFERENCES

- Bischof P., DuBerg S., Herrmann W., Sizonenko P. C.: Br. J. Obstet. Gynaecol. 88, 973 (1981).
- Brambati B., Mackintosh M. C. M., Teisner B., Magainess S., Shrimanker K., Lanzani A., Bonacchi I., Tulu L., Chard T., Grudzinskas J. G.: Br. J. Obstet. Gynaecol. 100, 324 (1993).
- Forest J. C., Massé J., Moutquin J.-M.: Clin. Biochem. 30, 333 (1997).
- Wald N. J., Kennard A., Hackshaw A. K.: Prenat. Diagn. 15, 1227 (1995).

## 30 DEFECTS OF GLYCOSPHINGOLIPID DEGRADATION STUDIED BY LOADING EXPERIMENTS IN CULTURED SKIN FIBROBLASTS FROM DIFFERENT LIPIDOSES – EXPERIMENTAL APPROACH

BEFEKADU ASFAW<sup>a</sup>, ROBERT DOBROVOLNÝ<sup>a</sup>, LINDA BERNÁ<sup>a</sup>, DETLEV SCHINDLER<sup>a</sup>, ERNST CONZELMANN<sup>b</sup>, and JANA LEDVINOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Inherited Metabolic Diseases, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, 128 08 Prague 2, Czech Republic, <sup>b</sup>Biozentrum, University of Würzburg, Würzburg, Germany

The degradation of glycosphingolipid substrates with different length and composition of oligosaccharide chains was studied in skin fibroblast cultures from normal controls and patients with inherited defects of lysosomal hydrolases, i.e.  $\alpha$ -galactosidase A (Fabry disease),  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase (Schindler disease),  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ( $\beta$ -hexosaminidase, GM2-gangliosidosis),  $\beta$ -glucocerebrosidase (Gaucher disease), ceramidase (Farber disease), sulphatidase (arylsulphatase A, sulphatidosis). Glycolipids A-6-2 (VI<sup>2</sup>- $\alpha$ -fucosyl-VI<sup>3</sup>- $\alpha$ -N-acetyl-galactosaminylneolacto-tetraosylceramide) B-6-2 (VI<sup>2</sup>- $\alpha$ -fucosyl-VI<sup>3</sup>- $\alpha$ -galactosyl-neolacto-tetraosylceramide), globoside (globotetra glycosylceramide) were isolated from erythrocyte membrane, sulphatides (galactosylceramide I<sup>3</sup>-sulphate) from human brain and labeled with tritium in the ceramide moiety<sup>1,2</sup>.

Three different ways of application of substrates and their internalization into cell were compared: 1) in the form of micelles; 2) in the form of unilamellar liposomes (composed from dioleoyl-phosphatidylcholine, phosphatidic acid Na salt and  $\alpha$ -tocopherol in the ratio 288:6:6 w/w/w); 3) in the form of unilamellar liposomes as above coated with apolipoprotein E<sub>3</sub> (recombinant – human).

The first two ways represent incorporation of lipid substrate into plasma membrane (by fusion or endocytosis) and its subsequent intracellular transport to the digestive compartment. Apolipoprotein E (ApoE) coating, enables targeted transport of substrates to lysosomes via ApoE receptors on the cell surface. For application of more complex glycosphingolipids, B-6-2, A-6-2 and globoside, ApoE coated liposomes were found vehicles of choice (uptake >15 % of substrate) in comparison with micelle form (3–5 %). Application without ApoE coating gave much lower uptake (<8 %).

Surprisingly, we didn't find any significant difference between application of sulphatides in liposomes with and without ApoE (uptake about 25 % in both cases) and increasing concentration of ApoE had no effect. However in micelle form, uptake was relatively low (5–7 %). Thus, application of

substrate in the liposome enables sufficient saturation of the lysosomal system with substrate which is always crucial point when control and mutant cell turnover rates are to be compared. Uptake of sulphatides can be mediated in both ways: via ApoE receptor (which is better characterized) and via plasma membrane incorporation and endocytosis.

ApoE including experiments were used to investigate degradation of A-6-2 glycolipid in  $\alpha$ -NAGA deficient cells<sup>1,3</sup>. It proved that enzyme defect in Schindler disease is also involved in the catabolism of lipids. Similarly, suspected defect in degradation of blood B glycolipids<sup>4</sup> was demonstrated by B-6-2 loading in Fabry cells. The degree of degradation of B-6-2 glycolipid and globotriaosylceramide produced from globoside *in situ* was higher in comparison with degradation of A-6-2 in  $\alpha$ -NAGA deficient cells. Participation of another enzyme (e.g.  $\alpha$ -NAGA) might be the case.

Degradation of A-6-2 in cells of different sphingolipidoses (see above) clearly demonstrated corresponding enzyme blocks. In sulphatidosis, defect of degradation was established by sulphatide loading and differences in residual activities between our infantile and juvenile patients were detected (5–25 % of controls). The same loading test can be used in Krabbe disease ( $\beta$ -galactosylceramidase deficiency).

This study clearly show the importance of loading experiments for study of catabolic pathways of glycosphingolipids. Quantitative interpretation of obtained data requires that number of relevant parameters (uptake rate, intracellular transport, precise experimental conditions, etc.) are taking into account and carefully monitored.

*This work was supported by the grants FRVS No. 1899/2000 and GAUK No. 37/2000/C.*

#### REFERENCES

1. Befekadu Asfaw, Schindler D., Ledvinová J., Šmíd F., Conzelmann E.: *J. Lipid. Res.* 39, 1768 (1998).
2. Berná L., Befekadu Asfaw, Conzelmann E., Ledvinová J.: *Anal. Biochem.* 269, 304 (1999).
3. Klima B., Pohlentz G., Schindler D., Egge H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 989 (1992).
4. Ledvinová J., Poupětová H., Písačka M., Elleder M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1345, 180 (1997).

#### 31 NAŠE ZKUŠENOSTI S VYŠETŘOVÁNÍM PROFILU OLIGOSACHARIDŮ V MOČI

KAROLÍNA PEŠKOVÁ, JANA LEDVINOVÁ,  
HELENA POUPĚTOVÁ, KVĚTUŠE VODIČKOVÁ,  
JANA SOVOVÁ a MILAN ELLEDER

*Ústav dědičných metabolických poruch VFN I. LF UK v Praze*

Oligosacharidy jsou sacharidy složené nejméně ze 3 monosacharidových jednotek spojených glykosidickou vazbou a navázaných na protein (glykoprotein) nebo lipid (glykolipid). K postupnému odbourávání oligosacharidové části těchto komplexních sloučenin dochází především v lysosomech buněk, kde je lokalizovaná celá řada hydrolytických enzymů včetně glykosidas. Při deficitu aktivity některé z glykosidas

dochází k hromadění oligosacharidů v lysosomech buňky a následně k vylučování charakteristických oligosacharidových struktur močí. Diferenciální diagnostika lysosomálních poruch spojených s akumulací oligosacharidů je problematická. Klinické příznaky pacientů s deficitem aktivity některé z glykosidas většinou zahrnují – orgánové stádání (kostní dysplazie, hepatosplenomegalie), faciální dysmorfii, progredující psychomotorickou retardaci. Morfologickým projevem lysosomálního stádání oligosacharidů a glykopeptidů jsou vakuoly v lymfocytech. Laboratorní analýzou lze prokázat zvýšené vylučování oligosacharidů močí. Na základě patologického nálezu v profilu oligosacharidů se následně u suspektních pacientů stanoví aktivita příslušného lysosomálního enzymu.

Vyšetření profilu oligosacharidů v moči je screeningová, principiálně jednoduchá metoda. Oligosacharidy jsou separovány pomocí tenkovrstevné chromatografie a detekovány cinolem (případně resorcinolem nebo ninhydrinem). Vylučování oligosacharidů močí klesá s věkem pacienta, jejich detekce u starších dětí je proto obtížnější. U některých jednotlivých glykoproteinos nacházíme zcela charakteristický profil oligosacharidů v moči. Týká se to především těchto onemocnění:  $\alpha$ -mannosidosa,  $\beta$ -mannosidosa,  $\alpha$ -fukosidosa,  $G_{M1}$  gangliosidosa, m. Schindler, sialidosa, aspartylglukosaminurie.

V roce 1999 byl v Ústavu dědičných metabolických poruch vyšetřen profil oligosacharidů v moči u 679 pacientů, z toho u 34 pacientů byl detekován patologický nález v profilu oligosacharidů, u 1 pacienta byla enzymaticky potvrzena diagnosa –  $\alpha$ -mannosidosa. Za uplynulých 10 let bylo diagnostikováno 15 pacientů postižených lysosomální poruchou spojenou s akumulací oligosacharidů.

#### LITERATURA

1. Sewell A.C., v knize: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics* (Hommes A. Frits). Wiley-Liss, USA 1991.
2. Suzuki Y., Sakuraba H., Akihiro O., v knize: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver Ch. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D.). Mc. Graw-Hill, USA 1995.

#### 32 STANOVENÍ PANKREATICKÉ ELASTASY 1 V SÉRU, STOLICI A MOČI

ZDISLAVA VANÍČKOVÁ<sup>a</sup>, PETR KOCNA<sup>a</sup>,  
TEREZA JEDINÁKOVÁ<sup>b</sup> a FRANTIŠEK SAUDEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Karlovo n. 32, 121 11 Praha 2, <sup>b</sup>Centrum diabetologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

Lidská pankreatická elastasa 1 [E.C.3.4.21.36] je syntetizována acinárními buňkami pankreatu. Enzym je secernován pankreatickou šťávou do duodena a proteinová sekvence použita pro imunochemickou detekci je pankreas-specifická a během střevní pasáže není degradována. Vzhledem k těmto parametrům je stanovení pankreatické elastasy (E1) výhodnější oproti dříve používané chromogenní metodice stanovení chymotrypsinu ve stolici. Stanovení E1 je proto vhodným



funkčním testem pankreatu<sup>1</sup>, jehož výsledek není ovlivněn ani medikamentózní substituční terapií. Aktivita lidské pankreatické elastasy 1 ve vzorcích stolice odráží míru exokrinní pankreatické funkce. Při zánětlivých procesech dochází také k retrográdnímu uvolnění E1 do krevního oběhu a kvantifikace sérové hladiny lidské pankreatické elastasy je vhodným markerem akutní pankreatitidy a karcinomu pankreatu<sup>2</sup>. Je rovněž popsáno stanovení E1 v pankreatické a duodenální šťávě. V tomto sdělení informujeme o nové metodice – stanovení E1 v moči pacientů s transplantací pankreatu.

Pro stanovení byly použity soupravy firmy ScheBoTech. Jedná se o ELISA techniku na mikrotitračních destičkách pro 96 vzorků ve stripovém uspořádání. Specificita soupravy je determinována monoklonální protilátkou k lidské pankreatické elastase 1, detekční systém je založen na POD-streptavidinem značené protilátce a reakci s ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt) jako substrátem. Koncentrace chromogenního markeru je stanovena fotometricky, výsledky jsou vyhodnoceny podle pětibodové kalibrační křivky. Citlivost metodiky je 0,5 ng.ml<sup>-1</sup> séra. Referenční hodnoty v séru jsou <3,5 ng.ml<sup>-1</sup>, ve stolici pak normální hodnoty >200 µg E1/g stolice, hodnoty svědčící pro lehkou a střední insuficienci pankreatu 100–200 µg E1/g stolice, pro těžkou insuficienci pankreatu <100 µg E1/g stolice. Stanovení E1 v moči bylo provedeno pomocí soupravy pro stanovení E1 v séru s vlastní modifikací protokolu. Celkem bylo vyšetřeno 35 vzorků séra, 49 vzorků stolice, 1 hrudní punktát a 123 vzorků moči.

Cílem této studie bylo analyzovat vzorky moči 15 pacientů, kteří podstoupili transplantaci pankreatu nebo ledvin a pankreatu v souvislosti s diabetickou nefropatií. Exokrinní sekrece transplantovaného pankreatu je u těchto osob drénována do močového měchýře. Hodnotili jsme 7 až 10 vzorků získaných od každého pacienta v průběhu 5 hodin za bazálních podmínek a po perorálním podání standardizovaného množství chemicky definované stravy. Ve vzorcích moči byly rovněž stanoveny hladiny lipasy a pankreatické amylasy.

Detekovatelná množství pankreatické elastasy 1 byla zjištěna u 14 z 15 pacientů za bazálních podmínek (0–65 mg.l<sup>-1</sup>) a u všech patnácti po stimulaci (0–73 mg.l<sup>-1</sup>). Rozmezí hodnot dalších stanovených enzymů byla následující: pankreatická amylasa 23–2135 µkat.l<sup>-1</sup>, lipasa 0–3232 mkat.l<sup>-1</sup>. Všechny tři stanovené markery vykazovaly po stimulaci obdobnou dynamiku.

V průběhu rejekce transplantovaného pankreatu je porušena také jeho exokrinní funkce. Proto doporučujeme monitorovat hladiny pankreatické elastasy 1 v moči pacientů, kteří podstoupili tento druh transplantace, spolu s dalšími markery rejekce transplantátu.

*Projekt byl částečně podpořen grantem ND 5295-3 IGA MZČR.*

#### LITERATURA

1. Soldan W., et al.: J. Ped. Gastroenterol. Nutrition 24, 53 (1997).
2. Homma T., Tsuchiya R.: Int. J. Pancreatol. 9, 119 (1991).

### 33 PHOSPHORYLATION OF HUMAN PEPSINOGENS DETECTED BY ANTIBODIES AGAINST PHOSPHOPROTEINS

PETRA MAJERČÁKOVÁ and ZDENKA KUČEROVÁ

*Department of Pathological Physiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, U nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic*

The human gastric mucosa contains two biochemically and immunochemically distinct types of secretory zymogens, pepsinogen A (PGA) and pepsinogen C (PGC)<sup>1</sup>. Both PGA and PGC consist of molecular variants PGA-1-5 and PGC-6,7 isozymogens that differ in net charge and can therefore be separated by electrophoresis<sup>2</sup>.

Human pepsinogens contain at least one phosphate group but there is not general agreement on the total number of such groups. Jensen et Foltmann<sup>3</sup> determined only one phosphoserine in PGA molecule. Hynek et al.<sup>4</sup> found one phosphate group in PGA molecule and two phosphate groups in PGC molecule (both were isolated from stomach mucosa of gastric cancer patients). The degree of phosphorylation of human pepsinogens seems to be associated with gastric diseases<sup>5</sup>.

We have studied human pepsinogens from gastric mucosa of patients with gastric cancer and gastric ulcer. Purified pepsinogens were separated by FPLC on UNO-Q1 ion/ex-

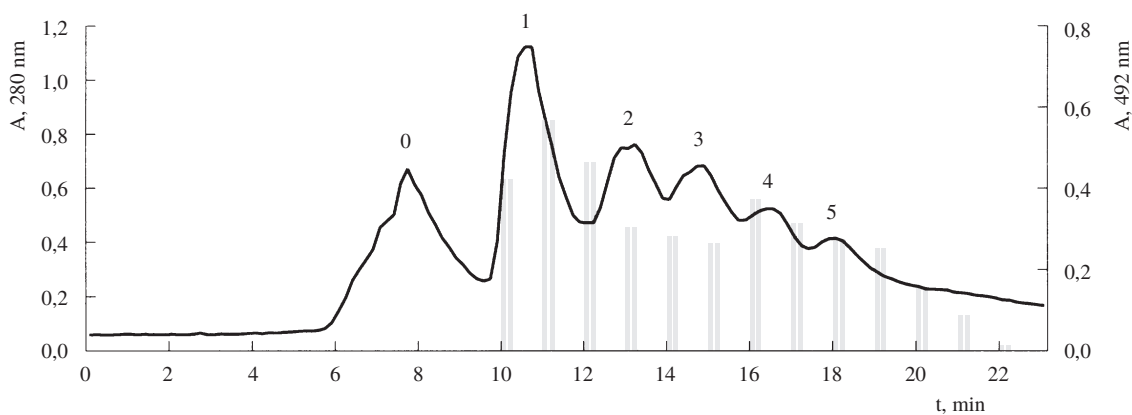


Fig. 1. FPLC of human pepsinogens followed by immunodetection using PoAb against phosphoproteins. Peak 1 corresponds to PGC, peak 2 to PGA-5, peak 3 to PGA-3, peak 4 to PGA-4 and peak 5 to PGA-2

change column and eluted by increasing gradient of NaCl. Proteolytic activity after activation with 1M-HCl was determined in fractions by the method of Anson and Mirsky<sup>6</sup> using hemoglobin as a substrate. Proteolytic active fractions were further analyzed using monoclonal antibodies (MoAb) to PGA or PGC and polyclonal antibodies (PoAb) to phospho-ser/tyr/thr in ELISA. Human pepsinogens were also separated by IEF in a polyacrylamide gel containing 2 % of carrier ampholytes which form narrow acidic pH range from 2.5 to 5 with subsequent western blotting on nitrocellulose. PGA and PGC isozymogens were recognised by the MoAb to PGA or PGC and some of them were detected by the PoAb to phosphoproteins.

One PGC and four PGA isozymogens were separated by FPLC on ion-exchange column. PGC corresponds to peak 1, PGA-5 to peak 2, PGA-3 to peak 4, PGA-4 (deamidated PGA-5) to peak 3 and PGA-2 (deamidated PGA-3) to peak 5. As it was previously described<sup>7</sup>, PGA-3 is eluted earlier than PGA-4 because of less negative charge. Peak 0 did not possess any proteolytic activity and was not recognised by the MoAb to PGA or PGC. Fractions with proteolytic activity were recognised either by PGA or PGC MoAbs and most of them were also stained by the PoAb to phosphoproteins (Fig. 1). The result was confirmed by IEF western blotting of human pepsinogens obtained from patients with gastric diseases. We detected one band corresponding to PGC and one, two or three corresponding to PGA isozymogens. As a positive control we used a phosphoprotein-ovalbumin according to his analogous isoelectric point. These results indicate that human pepsinogens contain one phosphate group in PGC molecule and at least one in PGA molecule.

*The Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 303/98/1121, supported the work.*

#### REFERENCES

1. Samloff I. M.: *Gastroenterol.* 96, 586 (1989).
2. Samloff I. M.: *Gastroenterol.* 57, 659 (1969).
3. Jensen A. L., Foltmann B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56, 69 (1996).
4. Hynek R., Kašíčka V., Kučerová Z., Káš J.: *J. Chromatogr. B* 688, 213 (1997).
5. Kučerová Z.: *J. Chromatogr. B* 489, 390 (1989).
6. Anson M. L., Mirsky A. E.: *J. Genet. Physiol.* 16, 59 (1932).
7. Bank R. A., Eriksson A. W., Pals G.: *J. Chromatogr.* 571, 47 (1991).

#### 34 DETEKCE HOMOCITRULINU V MOČI

OLGA MARTINCOVÁ, EVŽENIE POSPÍŠILOVÁ,  
EVA HRUBÁ a MILAN ELLEDER

*Ústav dědičných metabolických poruch VFN, Praha*

Homocitrulin je dibazická aminokyselina přítomná téměř v každé moči kojenců a dětí předškolního věku. Vylučování homocitrulinu je pravděpodobně závislé na příjmu bílkovin a postupně klesá s věkem. V moči starších dětí a dospělých se homocitrulin nachází pouze ve stopových množstvích.

V plazmě není homocitrulin detekován vůbec. Zvýšené vylučování homocitrulinu v moči nacházíme u některých pacientů s hyperornithinemií, u pacientů s částečným deficitem argininosukcinátsynthasy a často u pacientů s hyperlysinemií, hyperargininemií a sacharopinurií. Hyperornithinemie s hyperamonemií a homocitrulinurií – tzv. HHH syndrom – je pravděpodobně způsobena defektem mitochondriálního ornithinového transportu. Dědičnost HHH syndromu je autosomálně recesivní.

Ke klinickým příznakům patří zvýšená dráždivost a poruchy spojené s příjmem potravy v kojeneckém věku, poruchy vědomí, myoklonické křeče, třes, intermitentní ataxie, poruchy koordinace, opožděný růst, psychomotorická retardace. Na včasné zahájení nízkobílkovinné diety záchvaty ustávají, růst a intelektuální vývoj pokračuje.

Laboratorní nálezy vykazují zvýšené koncentrace ornithinu v plazmě, amoniaku v krvi, kyseliny orotové a homocitrulinu v moči. Ornithin v plazmě se stanoví při běžném profilovém vyšetření aminokyselin. Amoniak v plazmě a kyselina orotová v moči se stanoví fotometricky. Pro potvrzení diagnózy HHH syndromu je nezbytné stanovit hladinu homocitrulinu v moči. Při běžném profilovém vyšetření na automatickém analyzátoru aminokyselin metodou IEC s ninhydrinovou detekcí však homocitrulin koeluuje s methioninem a nelze jej tedy specificky detekovat.

V naší laboratoři byla zavedena metoda na stanovení homocitrulinu v moči. Homocitrulin je v prvním kroku separován od methioninu a ostatních aminokyselin pomocí tenkovrstevné chromatografie, následně eluován do vodného roztoku a kvantifikován na aminoanalyzátoru.

Touto metodou byla vyšetřena moč pacienta se suspektním HHH syndromem a potvrzeno zvýšené vylučování homocitrulinu – 28 mmol.mol<sup>-1</sup> kreatininu. Exkrece homocitrulinu uváděná v literatuře u pacientů s HHH syndromem se pohybuje v rozmezí 17–134 mmol.mol<sup>-1</sup> kreatininu, u zdravých kontrol 0–5 mmol.mol<sup>-1</sup> kreatininu.

#### LITERATURA

1. Bremer H. J., et al.: *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis.* Urban & Schwarzenberg, Mnichov 1981.
2. Valle D., Simell O., v knize: *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Scriver Ch. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., ed.). Mc Graw-Hill, New York 1995.

#### 35 VITAMIN A, VITAMIN E U DĚTÍ S HYPERCHOLESTEROLEMIÍ

MARIE TOMANDLOVÁ<sup>a</sup> a LENKA KOPEČNÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Biochemický ústav, Lékařská fakulta MU, Komenského n. 2, 662 63 Brno,* <sup>b</sup>*I. Dětská interní a onkologická klinika, DN JGM, Černopolní 9, 662 63 Brno*

Vitamin A, který je nezbytný např. v procesu vidění, má pouze mírné antioxidantní vlastnosti. Mnohem významnějším přirozeným lipofilním antioxidantem je vitamin E. Vitamin E se uplatňuje především v buněčných membránách. Při jeho přetrvávajícím deficitu dochází ke zvýšené peroxidaci lipidů.

Epidemiologické studie dokládají i jeho význam (spolu s karotenoidy a kyselinou askorbovou) u onkologických onemocnění.

K současnému stanovení vitaminů A a E byla použita modifikovaná HPLC metoda<sup>1</sup>. Vzorek po deproteinaci ethanolem byl extrahován do hexanu, odpařen v proudu dusíku a poté rozpuštěn v ethanolu. Jako vnitřní standard byl použit retinylacetát. Separace vzorků po extrakci byla prováděna na koloně C-18 (Hypersil ODS). Jako mobilní fáze byl použit 100 % methanol. Detekce vitaminů byla prováděna při vlnové délce 290 nm. Mez detekce je  $15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  pro vitamin A a  $300 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  pro vitamin E ( $S/N = 5$ ). Metoda je dostatečně citlivá a reprodukovatelná, lze ji použít k měření fyziologických koncentrací vitaminů v séru.

Koncentrace vitaminů A a E byla sledována u skupiny dětí ( $n = 19$ ) s hypercholesterolemií. U 78 % pacientů byla zjištěna snížená koncentrace vitaminu A. Hodnota koncentrace vitaminu E byla u všech pacientů v referenčním rozmezí. Byla nalezena statisticky významná závislost mezi vitaminem E a celkovým cholesterolem ( $R_s = 0,78$ ,  $P = 0,0001$ ), vitaminem E a apo B ( $R_s = 0,63$ ,  $p = 0,003$ ) a vitaminem E a LDL ( $R_s = 0,72$ ,  $p = 0,0005$ ). Vitamin A se žádným ze změřených parametrů nekoreloval. Zjištěné výsledky nejsou v rozporu s pozorováními prováděnými na dospělé populaci<sup>2</sup>.

## LITERATURA

1. Driskell W. J., Neese J. W., Bryant C. C., Bashor M. M.: *J. Chromatogr.* 231, 439 (1982).
2. Maes M., Weeckx S., Wauters A., Neels H., Scharpé S., Verkert R., Demedts P., Desnyder R.: *Clin. Chem.* 42, 1824 (1996).

## 36 LESK A BÍDA LINEÁRNÍ REGRESE

LUDEK DOHNAL

*Referenční laboratoř pro klinickou biochemii MZ ČR, Ústav klinické biochemie, Všeobecná fakultní nemocnice, Karlovo n. 32, 121 11 Praha 2*

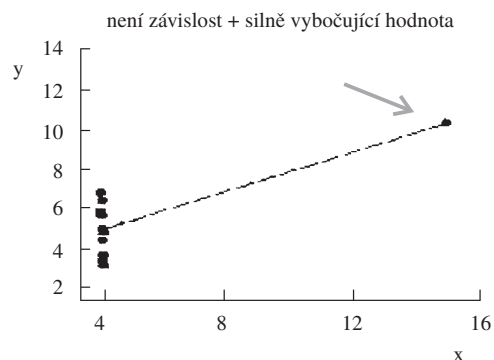
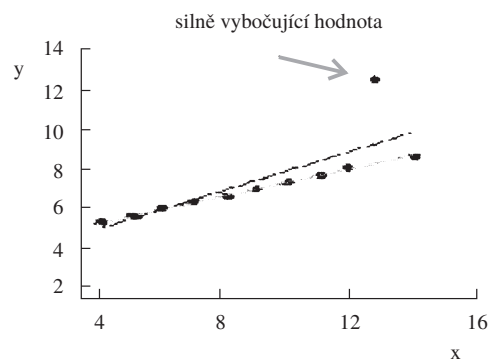
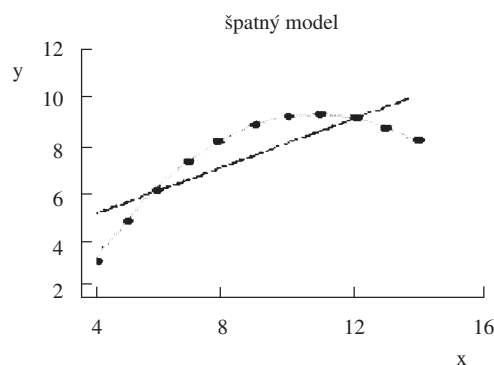
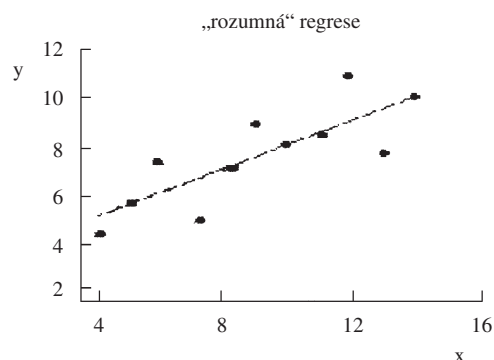
Motto: Existují tři druhy lži; 1. obyčejná lež, 2. diplomacie, 3. statistika (neznámý statistik?)

V publikační praxi je stále víc akcentován význam matematicko-statistických postupů pro zpracování dat. Bohužel se v důsledku toho častěji opakují nedostatky a tradují mýty, bez kterých bychom se rádi obešli. Na některá nedocenená úskalí lineární regrese chce poukázat toto sdělení.

V práci<sup>1</sup> jsou uvedeny čtyři testovací sady dat, jejichž hodnoty uvádí tabulka I. Ze samotných regresních statistik těchto dat uvedených v tabulce II by se zdálo, že pro všechny čtyři sady vyhovuje model regresní přímky přibližně stejně dobře. Při pohledu na obr. 1 je vidět, že tomu tak není.

Ve skutečnosti modelu přímky vyhovuje pouze první sada. Pro druhou sadu vyhovuje spíše model paraboly. Třetí sada obsahuje silně vybočující hodnotu, která zcela zkresluje výsledek regrese. Ve čtvrté sadě se vůbec nejedná o závislost a navíc i tady je přítomna silně vybočující hodnota. Z toho plyne mj. poučení, že samotné regresní statistiky nemusí vůbec nic vypovídat o vhodnosti modelu, tedy o tom, zda se jedná

o závislost např. přímkovou, kvadratickou či jinou. Dál např. to, že jediný odlehlý bod může ovlivnit regresní statistiky natolik, že hrozí nebezpečí úplně mylného závěru. A konečně,



Obr. 1. Regresní závislosti a data, z nichž vznikly

Tabulka I

Data z práce<sup>1</sup>; X = nezávisle proměnná, Y = závisle proměnná, n = 11

Poř. č. měření	Sada							
	1.		2.		3.		4.	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
1	10	8,04	10	9,14	10	7,46	8	6,58
2	8	6,95	8	8,14	8	6,77	8	5,76
3	13	7,58	13	8,74	13	12,74	8	7,74
4	9	8,81	9	8,77	9	7,11	8	8,84
5	11	8,33	11	9,26	11	7,81	8	8,47
6	14	9,96	14	8,10	14	8,84	8	7,04
7	6	7,24	6	6,13	6	6,08	8	5,25
8	4	4,26	4	3,10	4	5,39	8	2,50
9	12	10,84	12	9,13	12	8,15	8	5,56
10	7	4,82	7	7,26	7	6,42	8	7,91
11	5	5,68	5	4,74	5	5,73	8	6,89

Tabulka II

Regresní statistiky; regresní přímka:  $Y = A + B \cdot X$

	Sada			
	1.	2.	3.	4.
A	3,00	3,00	3,00	3,00
B	0,500	0,500	0,500	0,500
Vícenásobný korelační koeficient:	0,816	0,816	0,816	0,817
Střední kvadratická chyba predikce:	1,87	2,20	2,15	1,54
Reziduální součet čtverců:	13,76	13,78	13,76	13,74

o jak těsnou závislost se jedná je zřejmé především z grafu závislosti veličin, regresní statistiky mohou zcela zklamat. Na základě výše uvedeného lze doporučit, aby se lineární regrese (nejčastěji metodou nejmenších čtverců) používala obezřetně a to i z důvodů jiných, než které jsou ilustrovány v tomto sdělení. Nejprve je vhodné sestavit graf závislosti vysvětlované proměnné (typicky na ose y) na vysvětlující proměnné (typicky na ose x). Pak vizuálně posoudit, zda se vůbec jedná o „rozumnou závislost“. Pokud ano, pak posoudit, zda je tato závislost dostatečně těsná, aby mělo smysl počítat její regresi. Pokud je i toto splněno, potom je třeba odhadnout model regrese. Zdaleka to nemusí být pouze lineární model, často je vhodnější kvadratický, kubický či jiný. Pak teprve počítat regresní parametry a další statistiky pro zvolený model (modely). V případě rozpaků nám regresní statistiky, které jakoby kvantifikují kvalitu regrese, mohou pomoci zvolit vhodnější z modelů.

## LITERATURA

1. Anscombe F. J.: Amer. Statist. 27, 17 (1973).
2. Dohnal L.: <http://www.lf1.cuni.cz/~ldohna/vhodregr/obsah.htm>



**01 OXIDAČNÝ STRES A JEHO ROZPOZNANIE**

ZDENA ĎURAČKOVÁ, LUCIA HLINČÍKOVÁ,  
PETER KORYTÁR, ANNA LIPTÁKOVÁ  
a INGRID ŽITŇANOVÁ

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika*

V niektorých systémoch alebo pochodoch v organizme majú voľné radikály (VR) nezastupiteľnú úlohu v správnej funkcii mnohých biologických fenoménov. Na druhej strane, VR sú vysoko reaktívne látky, ktoré môžu reagovať s biologicky významnými molekulami a tým ich poškodzovať. Tvorba a účinok VR vo fyziologických procesoch sa musí kontrolovať a strážiť pomocou antioxidantných systémov, aby sa aktivita VR neobrátila proti vlastným biomolekulám. Ak niektorý z ochranných článkov organizmu proti toxicite VR zlyhá, ich účinkovanie sa stáva nekontrolované a dochádza k poškodeniu molekúl, buniek, orgánov a napokon celého organizmu<sup>1</sup>.

Dôsledok negatívneho pôsobenia VR sa označuje ako oxidačný stres a môže sa definovať ako nerovnováha medzi tvorbou a odstraňovaním VR v prospech ich tvorby, z ktorej vyplýva potenciálne poškodenie<sup>2</sup>.

Hĺbka poškodenia oxidačným stresom závisí *i*) od druhu poškodzovanej molekuly (proteíny, lipidy, nukleové kyseliny), *ii*) od mechanizmu, akým sa poškodenie uskutočňuje (chémia fentonového typu, indukcia určitým liekom, aktivácia enzýmov, napr. NO-syntázy, xantínoxidázy, atď.) a *iii*) od typu oxidačného stresu (napr. UV žiarenie, fajčenie, ischemicko-reperfúzne stavy, ozón, zápal). Oxidačný stres vyvolaný v organizme môže hrať úlohu pri vzniku alebo rozvoji mnohých ľudských ochorení<sup>3</sup>.

Je relatívne ťažké urobiť zodpovedajúci odhad nadmerného výskytu a aktivity VR v biologickom prostredí. Široko používané stanovenia malondialdehydu (MDA), alebo produktov reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (TBARP) ako diagnostických markerov peroxidického poškodenia tkanív vyžaduje určité úpravy. Nie je správne dávať do priameho súvisu nájdené zvýšené hodnoty MDA alebo TBARP v biologickom materiáli s výskytom t.zv. voľnoradikálových ochorení. Podobne zistené znížené hladiny rôznych antioxidantov nemusia vždy ukazovať na oxidačný stres. Pri charakterizácii oxidačného stresu je preto dôležité poznať okrem úrovne antioxidantného stavu a hladín jednotlivých antioxidantov tiež výskyt a koncentráciu produktov oxidačného poškodenia jednotlivých biomolekúl. V súčasnosti sa pozná viacero analytických metód na stanovenie produktov oxidačného poškodenia (tab. I) lipidov, proteínov a nukleových kyselín a aktivity alebo hladiny antioxidantných systémov<sup>4</sup>. Výhody, nevýhody a úskalnia jednotlivých stanovení budú diskutované.

Pomocou stanovenia produktov oxidačného poškodenia a ich koncentrácií a stanovenia hladín jednotlivých antioxidantov sa môže presnejšie vyhodnotiť účinkovanie VR v patológii chorôb a vyvodíť logické závery pre terapeutické podávanie antioxidantov.

*Prácu čiastočne finančne podporila grantová agentúra VEGA MŠ SR, grant 1/6145/99.*

## Tabuľka I

Najvýznamnejšie analytické metódy na vyhodnotenie oxidačného stresu<sup>2</sup>

*Oxidačné poškodenie DNA*

- Plynová chromatografia (GC) a hmotnostná spektrometria (MS) (oxidačne poškodené dusíkové zásady)
- Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) (produkty oxidačne poškodených nukleových kyselín)
- Elektroforetické metódy (kometová metóda)

*Oxidačné poškodenie lipidov*

- Stanovenie konjugovaných diénov (HPLC)
- Stanovenie izoprostánov (GC-MS)
- Stanovenie hydroperoxidov (HPLC)
- Stanovenie TBARP produktov (HPLC)

*Oxidačné poškodenie proteínov*

- Stanovenie karbonylových skupín proteínov (HPLC)
- Stanovenie modifikovaných tyrozínových jednotiek (HPLC)
- Stanovenie bityrozínov v moči (HPLC)
- Aktivity antioxidantných enzýmov
- Stanovenie aktivity superoxidodismutázy, katalázy a glutatiónperoxidázy

*Hladiny nízkomolekulových antioxidantov a vitamínov*

- Stanovenie koncentrácie vitamínov C a E,  $\beta$ -karoténu
- Stanovenie koncentrácie glutatiónov (GSH a GSSG)
- Stanovenie koncentrácie kyseliny močovej a alantoinu
- Stanovenie celkového oxidačného stavu

## LITERATÚRA

1. Ďuračková Z.: *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. SAP, Bratislava 1998.
2. Ďuračková Z., v: *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (II)* (Ďuračková Z., Bergendi L., Čársky J., ed.). SAP, Bratislava 1999.
3. Aruoma O.: *JAOCS* 75, 199 (1998).
4. Punched N. A., Kelly F. J. (ed.): *Free Radicals, a Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1996.

**02 VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY U NĚKTERÝCH DOSUD MÁLO SLEDOVANÝCH NEMOCÍ A STAVŮ**

VÁCLAV HOLEČEK<sup>a</sup> a JAROSLAV RACEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Oddělení klinické biochemie Mulačovy nemocnice, Plzeň,*  
<sup>b</sup>*Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice, Plzeň*

Volné radikály (VR) a antioxidanty (AO) jsou významné u tzv. „nemoci z volných radikálů“. Sem patří diabetes, nádory, stárnutí, revmatické záněty kloubů, katarakta, různé záněty atd. Chceme upozornit na řadu dalších nemocí a stavů, kterým není věnována dostatečná pozornost a lékařská veřejnost si často podíl volných radikálů u nich ani neuvědomuje.

*Nemoci gastrointestinálního traktu.* Progresivní periodontitida je podporována VR (leukocyty, plomby obsahující kovy, vyšší hladina glukózy, potrava obsahující VR, kouření aj.). Colitis ulcerosa – nadbytek volných radikálů (VR) oxiduje redukovaný glutathion (GSH), vzniklý GSSG prochází membránami a tak klesá nejdůležitější intracelulární antioxidant GSH. Crohnova choroba – zde jde spíše o poruchu syntézy GSH. Následkem krvácení ze stěny střevní se uvolňuje železo, Fentonovou reakcí vzniká volný hydroxylový radikál, rovněž spolupůsobí železo podávané pro anémii. VR a kyselina chloraná podporují vznik karcinomů. U cystické fibrózy pankreatu je snížena hladina antioxidantu selenu.

*Chirurgická onemocnění.* Při operacích vznikají volné radikály z leukocytů a následkem reperfúze po předchozí ischemii. Nezvyší-li se lipoperoxidace např. po okluzi a femoralis do hodiny, rekanalizace pravděpodobně nebude úspěšná. Rovněž popáleniny působí oxidační stres.

*Ortopedická onemocnění.* VR a AGE (advanced glycation end-products) usnadňují osteoklastům resorpci kostí při osteoporóze. U žen po menopauze nedostatek estrogenů, které působí jako AO, a ztráty zinku močí vedou ke snížené hustotě kostí. Polytraumata a velké operace jsou provázeny vzestupem VR následkem reperfúze po ischemii, dále zvýšeným odbouráváním purinů, zvýšenou produkcí VR v leukocytech a při polymeraci ortopedických cementů atd. VR poškozují fibroektin, který normálně zvyšuje aktivitu osteoblastů. U Sudekovy atrofie dochází k poškození extrakci kyslíku v postižené končetině, zánětu a vzestupu VR.

*Imunita a infekce.* Fagocyty, zvláště makrofágy, obsahují velké množství VR. Superoxid snižuje protilátkovou odpověď při imunizaci. Nelze však prostě říci, že oxidační stres působí imunodepresi a antioxidantní terapie naopak imunostimulaci. Septický šok zvyšuje tvorbu VR a prozánětlivých cytokinů. Některé kovy svou toxicitou nebo alergickým mechanismem podporují vznik autoimunitních stavů, např. sclerosis multiplex, amyotrofické laterální sklerózy, chronického únavového syndromu, deprese aj. Chřipkový virus i jiné viry aktivují ve fagocytech tvorbu superoxidu, proto mohou virové infekce přispívat k tvorbě karcinomů. Virus však umí potenciálně virocidní VR použít i ve svůj prospěch. Nedostatek selenu zvyšuje množství virových mutací a podporuje vznik nových virulentních forem, proti kterým lidé ještě nemají imunitu. Pozdní stadia virových replikací inhibují GSH. I infekce HIV zvyšuje lipoperoxidaci a s tím řadu klinických příznaků. VR poškozují parazity působící malárii. Přetřénování sportovců snižuje jejich antioxidantní obranu a tím i imunitu. Svalová hypoxie u intenzivní sportovní námahy a infiltrace svalů leukocyty, mechanická hemolýza a zvýšená teplota svalů (až 45 °C) působí vzniklými VR svalovou únavu.

*Plicní choroby.* ARDS působí zvýšené vylučování peroxidu vodíku dechem, VR inhibují účinek  $\alpha_1$ -antitrypsinu a zvyšují aktivitu myeloperoxidasy. Vzniklá kyselina chloraná i VR z neutrofilů těžce poškozují plicní tkáň. Podobně vzniká i fibrotizující alveolitida a plicní emfyzém. U bronchiálního astmatu stoupá množství VR a klesá aktivita superoxidodismutasy. U cystické fibrózy se uplatňuje tento mechanismus: chronická bakteriální infekce → tvorba VR → aktivace proteas → plicní fibróza a bronchiektazie → hypoxie a plicní hypertenze → respirační poškození a smrt. Inhalace toxických plynů či prachových částic se vlivem zánětu podílí na vzestupu VR a poškození plic. Příkladem je silikóza, azbestóza aj.

*Gynekologie a porodnictví.* Během menstruačního cyklu se značně mění ovariální hladiny antioxidantních enzymů a GSH. Spermatozoa produkují VR, proto má seminální plazma vysokou antioxidantní kapacitu. VR narušují povrch vajíčka, aby snáze došlo k oplodnění. Lipoperoxidace však rychle snižuje motilitu spermií. U eklampsie zvýšená hladina superoxidu inhibuje glutathionperoxidasu, zvýšená hladina peroxidů pak podporuje vznik tromboxanů. Při porodu následkem hypoxie a reperfúze stoupá v umbilikální krvi lipoperoxidace. Nedonošené děti mají nízkou antioxidantní obranu. Zvýšená hladina bilirubinu a kyseliny močové účinkují antioxidantně. Velkou roli ve vývoji kojence asi hraje mléko, jehož lipoperoxidace dítě ohrožuje. Syndrom náhlého úmrtí kojenců (SIDS) je spolupůsoben nedostatečnou antioxidantní schopností.

*Oční choroby.* Snížená antioxidantní kapacita a UV paprsky poškozují oko. U nedonošenců působí vysoký  $pO_2$  retinopatii. U vysokého nitroočního tlaku (ischemie) působí VR funkční alteraci retiny. Antioxidant melatonin zprostředkuje adaptaci fotoreceptorů na klesající intenzitu světla – čípky se zanořují a tyčinky vynořují. Makulární degenerace má nedostatek zeaxantinu a luteinu, kyseliny askorbové a pokles pigmentu v retině, kouření a/nebo modré světlo zvyšují VR, což může vést až k slepotě.

*Nervové choroby.* CNS je málo chráněn antioxidanty a snadno podléhá lipoperoxidaci, VR mohou poškozovat myelin. Mezi onemocněními, u kterých hrají VR důležitou roli, patří např. Alzheimerova či Parkinsonova choroba, epilepsie, tardivní dyskineza aj.

*Kožní choroby.* UV paprsky urychlují stárnutí kůže. U sklerodermie dochází k masivní lipoperoxidaci; ta poškozuje i vlasové folikuly u seborrhoické dermatitidy. Vitiligo má snížené epidermální hladiny některých AO. Význam VR a AO je popisován i u psoriasis, akne, rozacey, kožních transplantátů aj.

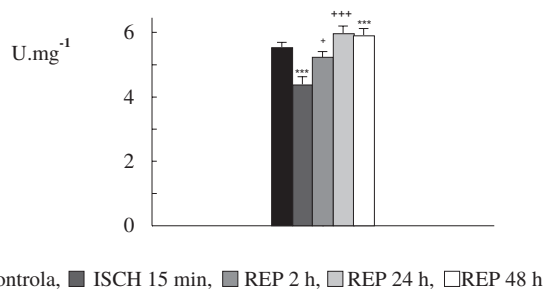
### 03 ISCHEMICKO-REPERFÚZNE POŠKODENIE CNS A OXIDAČNÝ STRES

ANNA DRGOVÁ, DUŠAN DOBROTA,  
JÁN LEHOTSKÝ, VIERA MÉZEŠOVÁ  
a MILENA MATEJOVIČOVÁ

*Ústav lekárskej chémie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovenská republika*

Ischemicko-reperfúzne poškodenie CNS vedie k narušeniu membránovej integrity neurónov a gliových buniek. Fosfolipidy, okrem toho, že sú základnou štruktúrou membrán, hrajú dôležitú úlohu pri prenose nervových vzruchov. Porušenie ich metabolizmu počas ischemie môže nepriaznivo ovplyvniť funkčnú aktivitu nervových buniek.

V rámci riešenia biochemických zmien v mozgovom tkanive počas globálnej ischemie a následnej reperfúzie sme sa zamerali na sledovanie zmien v cytosólovej frakcii neurónov z predného mozgu. Experimenty sme robili na potkanoch Wistar (300–350 g), ktorým globálnu ischemiu sme navodili metódou Pullsineli a spol. Cytosólovú frakciu sme získali metódou Dodda a spol.<sup>1</sup>, kde sme stanovovali aktivitu Cu, Zn superoxidodismutázy (SOD) použitím xantín – xantinoxidázového systému pre produkciu superoxidu a INT (iodphenyl-nit-



Obr. 1. Aktivita Cu, Zn-SOD v cytoplazme buniek predného mozgu po 15 min ischemii a následných reperfúziách v porovnaní s kontrolou

rophenyl-phenyltetrazoliumchlorid) pre jeho detekciu. V lipidických extraktach sme ďalej sledovali zastúpenie jednotlivých fosfolipidov rozdelených HPTLC.

Aktivita Cu, Zn superoxididmutázy (SOD) udaná v U.mg<sup>-1</sup> proteínu sa po 15 min. ischemii znížila o 20 % v porovnaní s kontrolou. Po obnovení prívodu kyslíka sa aktivita SOD upravuje k normálnym hodnotám ako sme pozorovali v rôznych časových intervaloch reperfúzie (obr. 1). Pretože k nadprodukcii voľných radikálov dochádza v počiatočných štádiách reperfúzie, zvýšená aktivita SOD poukazuje na určitý neuroprotektívny účinok pri ischemicko – reperfúznom poškodení mozgu.

Z literatúry je známe, že ischemia vedie k výraznej lipolyze membránových fosfolipidov v dôsledku stimulácie fosfolipáz<sup>2</sup>. V cytosóle nervových buniek sme zistili po ischemii pokles fosfatidylinozitolov (PI) o 40 % v porovnaní s kontrolou, podobne významné zníženie fosfatidylcholínov (PCH) a fosfatidyletanolamínov (PE). PI už po 2 hodinách reperfúzie sa upravujú na normálne hodnoty, čo odpovedá ich rýchlemu metabolickému obratu. Po 48 hodinovej reperfúzii pretrváva významný pokles iba PE. Počas ischemie je bloková

resyntéza fosfolipidov z nedostatku energie vo forme ATP (cit.<sup>3</sup>), čo vysvetľuje pokles fosfolipidov po 15 minútovej ischemii.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 7417/20.

#### LITERATÚRA

1. Dodd P. R. et al: Brain Res. 226, 107 (1981).
2. Kogure K., Nakano S., v: *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia* (Bazan N. G., Braquet P., Ginsberg M. D., ed.), str. 103. Plenum Press, New York 1992.
3. Agranoff B. W., Hajra A. K., v: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel G. J., Agranoff B. W., et al., ed.), str. 97. Raven Press, New York 1994.

#### 04 FREE RADICALS AS DAMAGING FACTORS IN ION HOMEOSTASIS *IN VITRO* AND DURING ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

JÁN LEHOTSKÝ<sup>a</sup>, PETER KAPLÁN<sup>a</sup>,  
RADOVAN MURÍN<sup>a</sup>, PETER RAČAY<sup>a</sup>,  
and LUC RAEYMAEKERS<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Malá Hora 4, 03601 Martin, Slovakia, <sup>b</sup>Catholic University of Leuven, Campus Gasthuisberg B-3000 Leuven, Belgium

Oxidative stress, initiated by reactive oxygen/nitrogen species (RONS) is recognized pathogenic factor in ischemia/reperfusion injury (IRI). The present study summarizes our results studying effect of both ROS *in vitro* and IRI condition *in vivo* on the physical state of membranes, activities and levels of ion transport proteins in rodent brain. Oxygen

Table I  
Effect of oxidant systems on biophysical properties of rodent ER membranes

Sample	Anisotropy $r_s$	$A_{233}/A_{215}$	Tryptophan fluorescence	Fluorescence $Ex_{350}/Em_{440}$
Control	0.217±0.001	0.274±0.009	79±5.3	20.4±1.3/19.3±1.2
Fe <sup>2+</sup>	0.227±0.002 <sup>a</sup>	0.311±0.026 <sup>a</sup>	31.2±1.4 <sup>a</sup>	54.5±0.6/52.4±3.0 <sup>a</sup>
Fenton	0.228±0.003 <sup>a</sup>	0.324±0.017 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.

Values are expressed as means ±SEM of 4–6 experiments, <sup>a</sup> statistically significant, p<0.05

Table II  
ATP dependent Ca<sup>2+</sup> uptake after two models of forebrain ischemia in gerbil

			Sham	Ischemia	Reperfusion
Ca <sup>2+</sup> uptake [nmol. mg <sup>-1</sup> ]	Occlusion	Pentobarbital	5.04±0.3	1.9±0.2 <sup>a</sup>	3.4±0.3
	Decapitation	Pentobarbital	6.1±1.2	3.0±0.3 <sup>a</sup>	n.d.

Values are expressed as means ±SEM of 4–6 experiments, <sup>a</sup> statistically significant p<0.05

derived radicals *in vitro* reduced both the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchanger of synaptosomal membranes. Physical state of membrane is also altered as detected by reduction of membrane fluidity<sup>1</sup>. Oxidative insult also lead to the loss of ability of neuronal endoplasmic reticular (ER) to sequester Ca<sup>2+</sup> as well as to the increase of Ca<sup>2+</sup> permeability and to the decrease of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity<sup>2</sup>. Furthermore, ROS induced both lipid peroxidation<sup>2</sup> and lipids-independent modifications of the ER membrane proteins as detected by fluorescence analysis of amino acyl residues (Table I).

Cerebral ischemia is known to alter ionic homeostasis, synthesis and lysis of proteins with activation of protease such as caspases and calpains. Acute *in vivo* ischemia alters kinetic parameters of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase affecting mainly dephosphorylation step with parallel changes of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchanger and alterations of physical membrane environment<sup>3</sup>. Ca<sup>2+</sup>-ATPase of plasma membrane (PMCA) was shown to have a distinct distribution pattern of isoforms in brain areas. Reperfusion after ischemia is associated with remarkable decrease of immuno signal for PMCA1 only in affected hippocampal area<sup>4</sup>. In addition, incubation of non-ischemic membranes with cytosol from ischemic hippocampus decreases level of PMCA 1<sup>o</sup> in non-ischemic tissues which suggests possible activation of calpains and/or caspases-like proteases. On the other hand, ischemia/reperfusion did not affect the level of Ca<sup>2+</sup> pump (SERCA 2b) and calreticulin of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. However, likely its cytoarchitectural location IRI resulted in decrease of IP<sub>3</sub> receptor type I and ischemic insult alters even active Ca<sup>2+</sup> accumulation which is not due to the inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity (Table II).

In parallel, ischemic insult induces in reperfusion period non specific alteration of physical properties of total membrane preparation such as modifications of proteins as well as content of lipoperoxidation products. In summary, we proved that free radicals are factors which can alter physical and functional properties of neuronal membranes. We discuss our results with idea that ischemia-induced disturbance of ion transport systems may participate or follow delayed death of neurons after ischemia.

Supported by the VEGA grant No. 7417/20.

Table I

Levels of CD, carbonyl and free SH groups in rat forebrain homogenate after ischemia and reperfusion injury<sup>a</sup>

	Conjugated diene A <sub>233</sub> /A <sub>215</sub>	Carbonyl groups nmol.mg <sup>-1</sup> protein	Free SH groups μmol.mg <sup>-1</sup> protein
Control	0.2534±0.0025	3.247±0.038	0.347±0.109
15' ischemia	0.2645±0.0027 <sup>b</sup>	3.288±0.068	0.345±0.065
15' ischemia/ 2 h reperfusion	0.2712±0.0033 <sup>d</sup>	3.498±0.061 <sup>b</sup>	0.227±0.028 <sup>b</sup>
15' ischemia/ 24 h reperfusion	0.2837±0.0022 <sup>d</sup>	3.696±0.055 <sup>d</sup>	0.170±0.047 <sup>d</sup>
15' ischemia/ 48 h reperfusion	0.2769±0.0059 <sup>d</sup>	3.801±0.089 <sup>d</sup>	0.201±0.028 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Values are expressed as means ±SEM of 7–12 experiments; <sup>b</sup> p<0.05, <sup>c</sup> p<0.01, <sup>d</sup> p<0.001; significantly different as compared to control

## REFERENCES

1. Lehotský J., Kaplán P., Račay P., Matejovičová M., Drgová A., Mézešová V.: *Life Sci.* 65, 1951 (1999).
2. Račay P., Kaplán P., Mézešová V., Lehotský J.: *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 41, 647 (1997).
3. Matejovičová M., Macháč S., Lehotský J., Jakuš J., Mézešová V.: *Mol. Chem. Neuropathol.* 29, 67 (1996).
4. Lehotský J., Kaplán P., Račay P., Mezešová V., Raeymakers L.: *Neurochem. Int.* 35, 221 (1999).

## 05 ISCHEMIA/REPERFUSION-INDUCED CHANGES IN PROTEINS AND LIPIDS OF RAT BRAIN HOMOGENATE

RADOVAN MURÍN, PETER KAPLÁN,  
DUŠAN DOBROTA, and JÁN LEHOTSKÝ

*Department of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, 037 54 Martin, Slovak Republic*

Oxygen free radicals may be implicated in the pathogenesis of ischemia-reperfusion damage. It is well known that brain cells are prone to oxidative damage because of their relatively low content of antioxidants, especially enzymatic ones, and of the high levels of both membrane polyunsaturated fatty acids (PUFA) and iron easily released from injured cells. Oxidative stress is postulated to share damage of lipids (LPO) and proteins (PPO) and consequently causes molecular changes leading to cell dysfunction and cell death<sup>1</sup>. Properties and alterations of oxidized proteins have been analyzed by several authors. Davies et al<sup>2</sup> recognized oxidizing free radicals capable of provoking aggregation or fragmentation, change in electric charge, loss of tryptophan and dityrosine formation in the exposed proteins; oxidized proteins showed an increased susceptibility to proteolytic enzymes.

We have investigated the influence of ischemia/reperfusion-induced oxidative stress on brain lipids and proteins. We used Wistar rats of both sexes with experimental 15-min four-



Table II  
Effect of ischemia/reperfusion injury on fluorescence parameters in rat forebrain homogenate<sup>a</sup>

Sample	Fluorescence intensity	
	Tryptophan	Dityrosine
Control	75.635±2.297	51.860±1.676
15' ischemia	71.146±3.028 <sup>b</sup>	52.943±2.536
15' ischemia/ 2 h reperfusion	70.397±1.329 <sup>b</sup>	55.461±2.078 <sup>b</sup>
15' ischemia/ 24 h reperfusion	67.978±2.680 <sup>c</sup>	56.595±2.425 <sup>c</sup>
15' ischemia/ 48 h reperfusion	61.853±6.203 <sup>c</sup>	55.696±2.736 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Values are expressed as means ±SEM of 7–12 experiments; <sup>b</sup> p<0.01, <sup>c</sup> p<0.001; significantly different as compared to control

-vessel global ischemia<sup>3</sup> followed by 2, 24 and 48 hours reperfusion, respectively. After decapitation, in forebrain homogenates were analyzed levels of conjugated dienes<sup>4</sup> (CD) to extent the lipid peroxidation. Concentrations of carbonyl<sup>5</sup> and free SH<sup>6</sup> groups, emission of tryptophane<sup>4</sup> and dityrosine<sup>7</sup> were measured to quantify PPO.

There are significant changes after 15-min ischemia in increasing level of CD. After ischemia in 15-min duration followed by 2, 24 and 48 hours reperfusion significant increase of levels of CD and carbonyl groups and decrease in free SH groups against control were revealed (Table I).

Protein fluorescence was analysed as an index of alteration in protein structure or conformation. Ischemia caused significant reduction of tryptophane fluorescence with a further reduction during the reperfusion periods (Table II). Significant increase in dityrosine fluorescence against control was observed after the reperfusion (Table II).

Our results indicate that peroxidation damage of lipids and proteins occurs mainly during period of recirculation when there where increased levels of LPO and PPO products as early as 2 hours after onset of reperfusion.

Supported by the VEGA Grant No. 7417/20.

## REFERENCES

1. Lee J. M., Zipfel G. J., Choi D. W.: *Nature* 399, 7 (1999).
2. Davies K. J.: *J. Biol. Chem.* 262, 9895 (1987).
3. Pulsinelli W. A., Brierley J. B., Plum F.: *Ann. Neurol.* 11, 491 (1982).
4. Kaplan P., Doval M., Majerova Z., Lehotsky J., Racay P.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 539 (2000).
5. Reznick A. Z., Packer L.: *Methods Enzymol.* 233, 357 (1994).
6. Sedlak J., Lindsay R. H.: *Anal. Biochem.* 25, 192 (1968).
7. Traverso N., Menini S., Cottalasso D., Odetti P., Marinari U. M., Pronzato M. A.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1336, 409 (1997).

## 06 POSÚDENIE INTENZITY LIPOPEROXIDÁCIE (LPX) V TKANIVE CNS POTKANOV STANOVENÍM PRODUKTOV REAGUJÚCICH S TBA (TBARP) SPEKTROFOTOMETRICKY A MALONDIALDEHYDU (MDA) METÓDOU HPLC

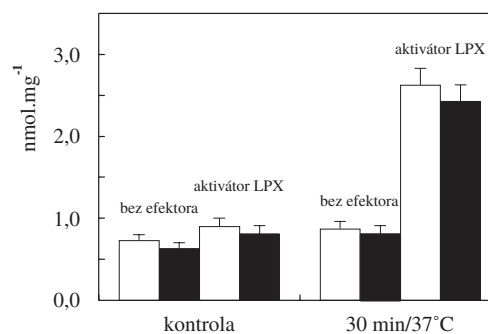
MONIKA KOZINKOVÁ, MARTA BRECHTLOVÁ  
a BRANISLAV LÍŠKA

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

Procesy LPX v CNS patria k dôležitým mechanizmom poškodzujúcim nervové tkanivo pri ischemicko-reperfúzných stavoch<sup>1</sup> s narušením štruktúr a funkčných procesov<sup>2,3</sup>. Dôležitou otázkou pri posúdení intenzity LPX je, či sa stanovuje MDA (koncový produkt LPX), alebo sa stanovujú aj iné medziprodukty LPX, ale uvádzajú sa ako množstvo MDA. Tento spôsob stanovenia sa potom uvádza ako nešpecifický a aj metodické otázky môžu zapríčiniť rozličnú interpretáciu výsledkov. Pre bližšie charakterizovanie intenzity a mechanizmov LPX sa používajú špecifické stanovenia medziproduktov LPX. Na stanovenie MDA sa používa hlavne HPLC (cit.<sup>4,5</sup>) a plynová chromatografia<sup>6</sup>. Cieľom práce bolo v tkanive CNS porovnať intenzitu LPX stanovením TBARP a MDA.

Intenzita LPX bola sledovaná stanovením produktov LPX v podmienkach neaktivovanej a aktivovanej LPX (aktivátor LPX = 125 μmol.l<sup>-1</sup> askorbát + 5 μmol.l<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup> 1:1). Po pridaní 0,6 % TBA bol farebný produkt, vytvorený inkubáciou v prostredí 2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, extrahovaný do *n*-butanolu. Produkty LPX boli po centrifugácii vzoriek stanovené spektrofotometricky – udávané ako množstvo TBARP, a komplex MDA-TBA použitím HPLC – delenie na kolóne RP-18 (5 μm), – prietok kolónou 0,9 ml.min<sup>-1</sup>, – mobilná fáza: fosfátový tlmivý roztok (pH 6,3):metanol (1:1) – UV detektor.

Intenzita LPX bola sledovaná stanovením produktov LPX spektrofotometricky (TBARP) a špecifickým stanovením MDA metódou HPLC. Oboma metódami sa získalo rovnaké množstvo produktov LPX (obr. 1), čo poukazuje na to, že vytvorené prekurzory MDA sa zrejme za týchto experimentálnych podmienok varom vzoriek v kyslom prostredí premenia na MDA. To, že bez efektora (aktivátora LPX) sa množstvo TBARP ani MDA po inkubácii prakticky nemení, ale po pridaní aktivátora LPX výrazne stúpa, poukazuje na to, že tento experimentálny



Obr. 1. Porovnanie stanovenia produktov LPX v homogenátoch mozgu potkana spektrofotometricky (TBARP) a HPLC (MDA-TBA) v nmol.mg<sup>-1</sup> bielkovín, □ spektrofotometricky, ■ HPLC

prístup umožňuje charakterizovať LPX aj z hľadiska aktivačných mechanizmov.

V literatúre popisované rozdielne výsledky obsahu produktov LPX merané spektrofotometricky a HPLC môžu potom pochádzať z rôznej kombinácie podmienok vo fáze prípravy vzoriek (roztok použitý na homogenizáciu tkaniva, jeho pH), v materiáli použitom na stanovenie (celý homogenát, či supernatant), resp. podmienok analytickej fázy experimentu (koncentrácia a druh kyseliny vo fáze tvorby farebného komplexu). Rôzne kombinácie podmienok prípravy vzoriek pred stanovením ako i podmienok stanovenia ukázali kedy sú rozdiely v množstve stanovených produktov LPX (cit.<sup>7</sup>).

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu MŠ SR č. 1/6145/99.*

## LITERATÚRA

1. Halčák L., Pecháň I., v: *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (II)* (Duračková Z., Bergendi L., Čársky J., ed.), str. 113. SAP, Bratislava (1999).
2. Lukáčová N., Halát G., Chavko M., Maršala J.: *Neurochem. Res.* 21, 869 (1996).
3. Burda J., Gottlieb M., Vanický I., Chavko M., Maršala J.: *Mol. Chem. Neuropathol.* 25, 189 (1995).
4. Csallany A. S., Ming der Guan, Manwaring J. D., Addis P. B.: *Anal. Biochem.* 142, 277 (1984).
5. Tatum V. L., Changchif Ch., Chow Ch. K.: *Lipids* 25, 226 (1990).
6. Ichinose T., Miller M. G., Shibamoto T.: *Lipids* 24, 895 (1989).
7. Kozinková M., Brechtlová M., Líška B., v: *Neurobiologie duševných porúch* (Houdek L., ed.), str. 100. Galén, Praha 1999.

## 07 VPLYV LIPOPEROXIDÁCIE NA DEGRADÁCIU PURÍNOVÝCH NUKLEOTIDOV V MOZGU POTKANA

LUBOMÍR KURAČKA, MONIKA KOZINKOVÁ,  
MARTA BRECHTLOVÁ a BRANISLAV LÍŠKA

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská republika*

Tkanivo CNS je citlivé na ischemicko-reperfúzne poškodenie kyslíkovými radikálmi najmä pre vysoký obsah lipidových štruktúr a nenasýtených vyšších karboxylových kyselín.

### Tabuľka I

Množstvá degradačných produktov purínových nukleotidov v homogenátoch mozgu potkana a množstvo MDA v podmienkach aktivovanej a neaktivovanej LPX (priemer  $\pm$ SEM); štatisticky významná aktivácia tvorby MDA <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , <sup>b</sup>  $p < 0,001$

	Aktivátor	MDA (nmol.g <sup>-1</sup> tkaniva)	Degradácie produkty PN tkaniva ( $\mu$ mol.g <sup>-1</sup> tkaniva)					kys. močová
			NMP	adenozín	inozín	hypoxantín	xantín	
0 min	kontrola	96 $\pm$ 10	1,40 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,08	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	–
	Fe <sup>2+</sup>	105 $\pm$ 2,4	1,36 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,10	0,11 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	–
30 min inkubácia pri 37 °C	kontrola	135 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,04	1,17 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,006
	Fe <sup>2+</sup>	366 $\pm$ 47 <sup>b</sup>	0,16 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,11	0,43 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,004

V týchto podmienkach dochádza k aktivácii lipoperoxidácie (LPX) a zásahu do metabolismu lipidov s následným porušením integrity bunky<sup>1,2</sup>, ako aj ovplyvneniu membránových enzýmov iónového transportu<sup>3,4</sup>. Degradácia purínových nukleotidov (PN) je dôležitý proces, ktorý sa aktivuje pri nedostatku kyslíka. V literatúre sú údaje o antioxidačnom pôsobení kyseliny močovej<sup>5</sup>, pričom pre možnosť jej vzniku v tkanive CNS svedčí lokalizácia xantinoxidázy v mozgových kapilárach<sup>6</sup>, no súčasne však aktivita xantinoxidázy môže byť zdrojom radikálov<sup>7</sup>. Cieľom práce bolo zistiť, či v homogenáte mozgu potkana podmienky aktivovanej LPX ovplyvňujú degradáciu PN.

Produkty degradácie PN boli sledované v homogenátoch mozgov potkanov Wistar v podmienkach neaktivovanej LPX (kontrola) a aktivovanej LPX v prítomnosti iónov železa (5  $\mu$ mol.l<sup>-1</sup>) po ich extrakcii do kyseliny chloristej (6,5 mol.l<sup>-1</sup>) metódou HPLC po delení na kolóne C<sub>18</sub> s reverznou fázou s UV detektorom pri vlnovej dĺžke 254 nm. Mobilná fáza bola zmes 2 % metanolu, 60 mmol.l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,95), prietok 1 ml.min<sup>-1</sup>. Množstvo IMP a AMP sa stanovovalo spoločne a je označené ako nukleozidmonofosfáty (NMP). Intenzita LPX bola sledovaná stanovením malondialdehydu (MDA) metódou HPLC na rovnakej kolóne pri vlnovej dĺžke 532 nm. Mobilná fáza bola zmes metanol/fosfátový tlmivý roztok (pH 6,3) v pomere 2:1, prietok 0,9 ml.min<sup>-1</sup>, retenčný čas bol 2,76 min (cit.<sup>8</sup>). Štatistická významnosť je hodnotená Man Whitneyovým U testom, počet členov v súboroch je 6.

V prítomnosti Fe<sup>2+</sup> po 30 minútovej inkubácii homogenátov mozgu potkanov pri 37 °C dochádza k aktivácii LPX, o čom svedčí výrazný vzostup MDA. Rovnaký čas inkubácie vedie k vzostupu degradácie PN, pričom aktivácia LPX neovplyvňuje tvorbu degradačných produktov PN (tab. I). Z týchto výsledkov sa dá usudzovať, že ak aj je v uvedených podmienkach následkom procesov LPX potlačená aktivita ATP-áz, o čom by mohli svedčiť literárne údaje<sup>3,4</sup> tento zásah sa neprejaví v zmenenom množstve tvorby degradačných produktov PN.

Bezprostredne po dekapitácii sa v pripravených homogenátoch touto metódou nezistila kyselina močová, kým po 30 minútovej inkubácii sa dalo jej množstvo stanoviť (20–30 nmol.g<sup>-1</sup> tkaniva).

*Táto práca bola podporená grantom MŠ SR č. 1/6145/99*

## LITERATÚRA

1. Račay P., Kaplán P., Mézešová V., Lehotský J.: *Bratisl. Lek. Listy* 99, 176 (1998).
2. Lukáčová N., Gottlieb M., Maršala J., v: *Biologické*

podklady psychických porúch (Houdek L., ed.), str. 145. Galén, Praha 1997.

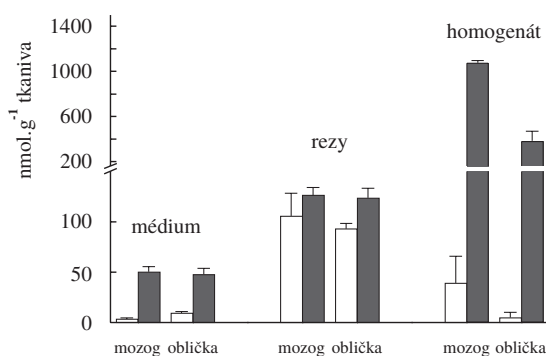
- Račay P., Matejovičová M., Drgová A., Dobrota D., Kaplán P., Lehotský J., Mézešová V.: Bratisl. Lek. Listy 99, 386 (1998).
- Rauchová H., Drahotka Z., Koudelová J.: Physiol. Res. 48, 73 (1999).
- Yu Z. F., Bruce-Keller A. J., Goodman Y., Mattson M. P.: J. Neurosci. Res. 53, 613 (1998).
- Betz A. L.: J. Neurochem. 44, 574 (1985).
- Kinuta Z., Kimura M., Itokawa M., Kikuchi H.: J. Neurosurg. 71, 417 (1989).
- Zima T., Štípek S., Crkovská J., Pláteník J.: Klin. Biochem. Metab. 3, 98 (1995).

## 08 REZY MOZGOVEJ KÓRY A OBLIČKY AKO MODEL PRE ŠTÚDIUM LIPOPEROXIDÁCIE

LUKÁČ HALČÁK, VIERA RENDEKOVÁ,  
PETER BOOR a MÁRIA SILVAŠIOVÁ

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

Proces lipoperoxidácie v rôznych tkanivách sa sleduje použitím rôznych lipoperoxidačných agens, ktoré sú schopné produkovať reaktívne formy kyslíka (RFK). Tieto látky, predovšetkým hydroxylový radikál, spúšťajú kaskádu pochodov lipoperoxidácie hlavne membránových štruktúr, na konci ktorej je vznik malondialdehydu (MDA). Takéto štúdie sa v podmienkach *in vitro* často uskutočňujú v homogenátoch tkanív, kde sú štruktúry buniek rozrušené a tak sú podmienky experimentu výrazne odlišné od podmienok *in vivo*<sup>1</sup>. Pokúsili sme sa vypracovať experimentálny model pre štúdium tvorby a účinku RFK v podmienkach, ktoré by viac simulovali stav *in vivo*. Vhodnou cestou sa nám javí použitie tkanivových rezov mozgovej kôry a rezov obličky. Keď je pripravený rez inkubovaný vo vhodnom médiu, kde sú prítomné potrebné ióny a glukóza, tak sú bunky rezu schopné metabolizmu, ktorý je dosť blízky podmienkam v neporušenom tkanive so schopnosťou regenerovať ako energeticky dôležité látky, tak i redukované ekvivalenty.



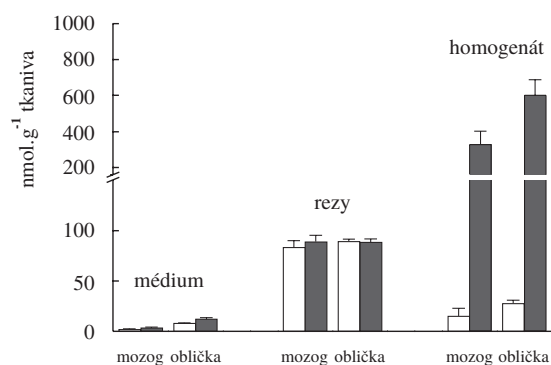
Obr. 1. Tvorba MDA v rezoch a homogenátoch mozgovej kôry a obličky účinkom zmesi Fe<sup>2+</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, biely stĺpec – kontrola, tmavý stĺpec – vzorka

V našich pokusoch sme v pripravených rezoch mozgovej kôry a obličky potkanov stimulovali lipoperoxidáciu použitím dvoch druhov zmesí a to Fe<sup>2+</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alebo Fe<sup>2+</sup> a kyselina askorbová. Lipoperoxidáciu sme určovali stanovením MDA pomocou kyseliny tiobarbiturovej. Ako médium pre inkubáciu rezov mozgovej kôry alebo obličky sme použili Krebsov-Ringerov tlmivý roztok, pH 7,4, obohatený o glukózu v koncentrácii 10 mM. Po 10-minútovej predinkubácii v základnom inkubačnom médiu sme rezy preniesli do inkubačného média, ktoré navyše obsahovalo 1 mM-Fe<sup>2+</sup>, 1 μM-EDTA a 3 mM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a inkubovali 30 minút. V druhej skupine experimentov inkubačné médium obsahovalo 250 mM kyselinu askorbovú a 10 μM-Fe<sup>2+</sup>. Po inkubácii sme v inkubačnom médiu stanovili z rezov do média uvoľnený MDA. Z rezov sme pripravili homogenáty a v nich stanovili MDA. Stanovenie MDA sme robili po reakcii s kyselinou tiobarbiturovou jednak fotometricky po extrakcii farebného produktu do *n*-butanolu a tiež po izokratickej separácii na reverznej fáze pomocou HPLC. Ako elučný roztok sme použili zmes fosfátový tlmivý roztok – metanol. Z mozgovej kôry a obličky sme súčasne pripravili homogenáty, pridali zmes Fe<sup>2+</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alebo Fe<sup>2+</sup> a kyselina askorbová v rovnakých koncentráciách aké sa nachádzali v médiách pri inkubácii rezov a inkubovali 10 minút. Po inkubácii sme v homogenátoch stanovili MDA.

Lipoperoxidácia v rezoch i homogenátoch mozgovej kôry a obličky potkanov účinkom zmesi Fe<sup>2+</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je znázornená na obrázku 1. V rezoch oboch tkanív bola tvorba MDA približne rovnako intenzívna, pričom sa z rezov do média vyplavilo značné množstvo MDA v porovnaní s kontrolnými rezi. V homogenátoch mozgovej kôry a obličky nastala už počas 10-minútovej inkubácie oveľa intenzívnejšia tvorba MDA ako v rezoch tkanív. Prejavilo sa to hlavne v homogenáte mozgovej kôry, kde sme zistili skoro trojnásobné množstvo MDA ako to bolo v homogenátoch obličky.

Pri použití lipoperoxidačnej zmesi Fe<sup>2+</sup> a kyselina askorbová sme zistili určitý náznak lipoperoxidácie len v rezoch obličky (obr. 2). V homogenátoch, pri použití tejto zmesi, nastala výrazne miernejšia lipoperoxidácia ako pri použití zmesi Fe<sup>2+</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pričom intenzívnejšie prebehla lipoperoxidácia v homogenáte obličky.

Záverom možno konštatovať, že použitie modelu tkanivových rezov by mohlo nájsť uplatnenie pri testovaní lipoperoxidačného účinku látok, prípadne pri štúdiu antioxidantného pôsobenia antioxidantov. Výsledky našich pokusov tiež po-



Obr. 2. Tvorba MDA v rezoch a homogenátoch mozgovej kôry a obličky účinkom zmesi Fe<sup>2+</sup> a kyselina askorbová, biely stĺpec – kontrola, tmavý stĺpec – vzorka

ukázali na to, že tkanivový rez vykazuje podstatně vyššíu antioxidantní aktivitu v porovnání s homogenátem toho istého tkaniva.

*Táto práca bola podporená grantom MŠ SR 1/6145/99.*

#### LITERATÚRA

1. Brechtlová M. a spol.: *Súhrny prednášok a posterov. V. Diabetologicko-biochemické dni, Bardejovské kúpele, 1995*, str 7.

### 09 MOBILIZACE PŘIROZENÝCH ANTIOXIDAČNÍCH MECHANISMŮ NA MODELU ISCHEMICKO REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ TENKÉHO STŘEVA POTKANA

HANA ČÍŽOVÁ, ANTONÍN LOJEK,  
LUKÁŠ KUBALA a MILAN ČÍŽ

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

Cílem této práce bylo přispět k objasnění úlohy antioxidantních adaptačních mechanismů v patogenezi ischemicko-reperfuzního (I/R) poškození vyvolaného reaktivními kyslíkovými metabolity (RKM).

Ischemie byla navozena u potkanů kmene Wistar v celkové anestezii zaškrcením arteria mesenterica na 45 minut. Uvolněním okluze byla následně vyvolána reperfuze. Vzorokry krve byly odebrány po uplynutí ischemie a dále v hodinových intervalech během 4 hodin postischemické fáze. Pro studium změn v extracelulární antioxidantní kapacitě séra na tomto modelu byla zavedena chemiluminiscenční (CL) metoda měření parametru úplného vychytání peroxylových radikálů (TRAP). Metoda luminolem zesílené chemiluminiscence byla také použita pro sledování oxidativního vzplanutí neutrofilů jako ukazatele produkce RKM. Aktivita myeloperoxidasy (MPO) v séru a střevní tkáni byla sledována spektrofotometricky.

V odpovědi na oxidační stres se významně zvýšil počet polymorfonukleárních leukocytů (PMNL) a CL plné krve od druhé hodiny reperfuze. Zvýšení oxidativního vzplanutí tedy bylo způsobeno především zvýšením počtu cirkulujících polymorfonukleárů. Změny v počtu leukocytů a lymfocytů nebyly statisticky významné. Aktivita MPO byla významně zvýšena na konci ischemie a toto zvýšení přetrvávalo po celou dobu postischemické periody<sup>1</sup>.

V další studii byla věnována zvláštní pozornost porovnání časového rozvoje změn v antioxidantní kapacitě séra během časné (od jedné do čtyř hodin) a pozdní postischemické periody (od jednoho do čtyř dnů) za využití stejného experimentálního modelu ischemie a reperfuze tenkého střeva potkana.

Byla potvrzena jednak zvýšená mobilizace fagocytů i uvolňování RKM do cirkulace v první a druhé hodině po ischemii. TRAP séra byl zvýšen již na konci ischemické periody a významné zvýšení trvalo během celé časné postischemické periody. Zvýšení antioxidantní kapacity séra bylo dostatečné k prevenci lipidové peroxidace (měřené testem kyseliny thio-barbiturové – TBARS) jak v séru tak i ve střevní tkáni. Co se týče pozdní postischemické fáze, hodnota antioxidantní kapacity pouze oscilovala kolem kontrolní hladiny.

V další části práce byl u kontrolních i pokusných potkanů zkoumán příspěvek individuálních sérových antioxidantů (kyseliny askorbové, kyseliny močové, alfa-tokoferolu a albuminu) k celkové antioxidantní kapacitě. Koncentrace jednotlivých antioxidantů v séru byly určeny spektrofotometricky a dále znásobeny příslušnými stechiometrickými faktory, čímž byl vypočítán TRAP. Bylo zjištěno, že experimentálně naměřené zvýšení hodnoty TRAP na konci ischemie a během prvních dvou hodin po ischemii je doprovázeno zvýšením koncentrace kyseliny askorbové a kyseliny močové v séru. Na druhé straně koncentrace alfa-tokoferolu a albuminu zůstaly beze změn. Hodnota TRAP vybraných antioxidantů vypočítaná z jejich sérových koncentrací a stechiometrických faktorů byla však mnohem nižší než TRAP měřený experimentálně<sup>2</sup>.

Originálním a nejdůležitějším výsledkem těchto studií bylo zjištění, že přirozené antioxidantní mechanismy v organismu jsou mobilizovány již na konci 45-minutové ischemie tenkého střeva potkana v důsledku oxidačního stresu a jejich mobilizace trvá ještě 4 hodiny po reperfuzi. Tyto ochranné mechanismy jsou však vyčerpány během prvního dne postischemické periody. Sérum zvířat s experimentálně navozenou I/R tenkého střeva obsahuje ještě další důležité antioxidant(y) který(é) jsou teprve potřeba identifikovat.

*Tato práce byla podpořena granty GAČR 524/98/0190, GA ČR 524/99/DO22.*

#### LITERATURA

1. Lojek A., Číž M., Slavíková H., Dušková M., Vondráček J., Kubala L., Rácz I., Hamar J.: *Free Radical Res.* 27, 359 (1997).
2. Slavíková H., Lojek A., Hamar J., Dušková M., Kubala L., Vondráček J., Číž M.: *Free Radical Biol. Med.* 25, 9 (1998).

### 10 TVORBA RADIKÁLŮ MITOCHONDRIÁLNÍHO DÝCHACÍHO ŘETĚZCE V MYOKARDU POTKANA. VLIV CAPTOPRILU A L-ARGININU

JANA DIVIŠOVÁ<sup>a</sup>, HANA VAVŘÍNKOVÁ<sup>a</sup>,  
MILADA TUTTEROVÁ<sup>a</sup>, PAVEL STOPKA<sup>b</sup>  
a ZDENĚK DRAHOTA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Metabolické pracoviště, Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4,* <sup>b</sup>*Ústav anorganické chemie, Akademie věd ČR, 250 68 Řež,* <sup>c</sup>*Fysiologický ústav, Akademie věd ČR, Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4*

Toxické radikály kyslíku se mohou podílet na ischemicko-reperfuzním poškození myokardu. Jedním z hlavních potenciálních zdrojů elektronů pro jejich vznik jsou mitochondrie. V průběhu přenosu elektronů dýchacím řetězcem mitochondrií (MDŘ) přecházejí jeho sloučeniny částečně do radikálové formy. Za ischemie je tok elektronů zastaven, protože není umožněn jejich přenos na kyslík. V MDŘ se tak hromadí elektrony, které převádějí sloučeniny MDŘ do radikálové formy. Tyto radikálové formy lze přímo stanovit pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR) při teplotě 77 K. V této studii byl na mitochondriích izolovaných ze srdce potkana



sledován vliv ischemie a reoxygenace na 3 typy těchto sloučenin (g faktor charakterizuje druh radikálu):

- \*FeS<sub>1</sub> – radikál NADH dehydrogenasy (g = 1,935)
- \*QH – radikál ubisemiquinonu (g = 1,967) – kritické místo pro uvolnění elektronů a vznik volných kyslíkových radikálů
- \*FeS<sub>2</sub> – radikál sukcinát dehydrogenasy (g = 2,018)

Výsledky pokusů ukázaly, že množství \*FeS<sub>2</sub> a \*QH v izolovaných mitochondriích se během 10 min. inkubace bez přístupu kyslíku zvýšilo u \*FeS<sub>2</sub> z 10,8 na 14,9 a u \*QH z 13,7 na 24,5 arb. j. Po 5 min. reoxygenace se obsah \*FeS<sub>2</sub> a \*QH vrátil na úroveň normoxie (9,7 a 15,2 arb. j.). U \*FeS<sub>1</sub> nedocházelo k žádným změnám, protože enzym NADH dehydrogenasa neměl za našich experimentálních podmínek přísun substrátu.

Obdobné nálezy jsme získali přímo v izolovaném perfundovaném myokardu potkana zmrazeném za normoxie, na konci 25 minutové ischemie a po 5 minutách reperfuze. Obsah radikálových forem sloučenin MDR se v myokardu zvýšil za ischemie (\*QH: z 1,51 na 3,08; \*FeS<sub>1</sub>: z 1,14 na 2,65 arb. j.) a na konci 5ti minutové reperfuze se vrátil k normoxickým hodnotám (1,09 a 1,13 arb. j.). Narozdí od izolovaných mitochondrií, ve vzorcích srdce se neměnily signály \*FeS<sub>2</sub>, protože substrát pro tento enzym – sukcinát – se v srdci prakticky nevyskytuje.

Další pokusy byly provedeny u potkanů, kterým byl 4 týdny podáván inhibitor angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE-I) captopril (v pitné vodě 50 mg.l<sup>-1</sup>) a kde byl při perfuzi izolovaného myokardu přidáván do perfuzního média L-arginin, substrát pro syntézu oxidu dusnatého NO (1 mmol.l<sup>-1</sup>, 10 min před ischemií). Aplikace captoprilu a L-argininu vedla ke zvýšení tvorby NO (měřeno jednak uvolňování do perfuzátu jako koncentrace jeho stabilních metabolitů NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Griessovou reakcí, jednak obsah v srdci pomocí EPR jako signál „dinitrosyl iron komplexu“ (DNIC, g = 2.03) (cit.<sup>1</sup>). Vedle zvýšení produkce NO byl nalezen výrazně nižší obsah radikálových forem sloučenin MDR, zvláště za ischemie. Uvedené výsledky ukazují, že captopril v kombinaci s L-argininem snížil nebezpečí vzniku kyslíkových radikálů během reperfuze. Tyto výsledky poskytují nový pohled na kardioprotektivní účinky ACE-I.

*Tato práce byla podpořena grantem IGA 6367-3 a VZ/CEZ: L17/98:00023001.*

#### LITERATURA

1. Vanin A. F.: Biokhimiya 63, 782 (1998).

### 11 CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA SÉRA V PODMÍNKÁCH ISCHEMIE A REPERFUZE TENKÉHO STŘEVA POTKANA A MOŽNOSTI JEJÍHO OVLIVNĚNÍ

MILAN ČÍŽ, IVANA PAPEŽÍKOVÁ, HANA ČÍŽOVÁ, LUKÁŠ KUBALA a ANTONÍN LOJEK

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

V našich dřívějších studiích jsme zjistili zvýšení celkové antioxidační kapacity séra u laboratorního potkana po indukci

ischemie/reperfuze tenkého střeva. Po zhodnocení příspěvku jednotlivých základních sérových nízkomolekulárních antioxidantů (kyselina močová, kyselina askorbová, a-tokoferol) k tomuto fenoménu bylo zjištěno, že asi za 35 % antioxidační aktivity séra jsou zodpovědní jeho další, dosud neidentifikované složky. Cílem předkládané práce bylo ohodnotit příspěvek dalších potenciálních antioxidantů v krevním séru k jeho celkové antioxidační kapacitě a možnost jejího případného ovlivnění exogenními antioxidanty.

Ischemie tenkého střeva laboratorního potkana kmene Wistar (250–3000 g) byla navozena v celkové anestezii (ketamin, xylazin) zaškrcením arteria mesenterica superior po dobu 45 minut. Po uvolnění svorky byla navozena reperfuze. Vzorky krve byly odebírány srdeční punkcí 2 a 4 hodiny po reperfuzi. Do pokusu byla dále zahrnuta intaktní kontrolní skupina a skupina s provedenou laparotomií bez navození ischemie/reperfuze. Celková antioxidační kapacita krevního séra byla sledována luminolem zesílenou chemiluminiscencí jako schopnost vychytávat peroxylové radikály. Ve vzorcích séra byly dále spektrofotometricky měřeny jednotlivé nízkomolekulární antioxidanty: kyselina močová (komerční souprava, 520 nm), albumin (reakce s 5,5-dibrom-*o*-kresolsulfonftaleinem, 600 nm), ceruloplazmin (reakce s *o*-dianizidinem, 540 nm) a celkové SH skupiny (reakce s kyselinou dithionitrobenzoovou, 412 nm). Aktivita superoxididmutasy byla stanovována spektrofotometricky (470 nm) jako schopnost inhibovat tvorbu formazanu v reakci superoxidového anionu s tetrazoliovou solí XTT. Peroxidace lipidů v séru a ve střevní mukóze byla stanovována spektrofotometricky jako reaktivní substance kyseliny thio-barbiturové.

Ze sledovaných jednotlivých nízkomolekulárních antioxidantů vykazovala podobné změny jako celková antioxidační kapacita séra pouze kyselina močová (r = 0,93). Celkové SH-skupiny se po mírném poklesu (2 hodiny po reperfuzi) vracely na kontrolní hodnoty (4 hodiny po reperfuzi). Tyto změny byly téměř výhradně způsobeny změnami v proteinových SH-skupinách, zatímco podíl neproteinových SH-skupin byl zanedbatelný. Po ischemii/reperfuzi tenkého střeva došlo též k poklesu sérového albuminu a ceruloplazminu. S výjimkou kyseliny močové vykazovaly všechny studované nízkomolekulární antioxidanty slabou, statisticky nevýznamnou, zápornou korelaci s celkovou antioxidační kapacitou séra. Z enzymatických antioxidantů byla měřena pouze aktivita superoxididmutasy – byl zjištěn nárůst 2 i 4 hodiny po reperfuzi. Zvýšená celková antioxidační kapacita séra nezabránila peroxidaci lipidů v séru a ve střevní mukóze.

V další sérii pokusů byly potkanům intraperitoneálně aplikovány deferroxamin (chelátor železa) a dimethylthio-urea (vychytávač hydroxylového radikálu) v dávce 10 mg.kg<sup>-1</sup> živé váhy těsně před navozením ischemie. Obě látky neměly žádný účinek na metabolickou aktivitu fagocytů v plné krvi (tvorbu reaktivních kyslíkových metabolitů měřenou chemiluminiscenčně) a vyvolaly pouze mírné zvýšení celkové antioxidační kapacity v séru. Jejich protektivní účinek se projevil především ve snížené peroxidaci lipidů ve střevní mukóze.

*Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 524/98/0190.*

## Tabulka I

Vliv allopurinolu na parametry I/R poškození tkání; data představují průměrné hodnoty  $\pm$  střední chybu průměru,  $n = 6$ . Pomocí symbolů je vyjádřen statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) od intaktní kontroly (<sup>a</sup>) a od skupiny s indukovanou I/R bez aplikace allopurinolu (<sup>b</sup>)

	Kontrola	Sham	I/R		
			bez allopurinolu	allopurinol v pitné vodě	allopurinol i.p.
CL (OZP) [mV.s]	1439 $\pm$ 141	23946 $\pm$ 2913 <sup>a</sup>	38212 $\pm$ 6874 <sup>a</sup>	22699 $\pm$ 6504 <sup>a</sup>	30056 $\pm$ 4956 <sup>a</sup>
CL (PMA) [mV.s]	352 $\pm$ 40	1190 $\pm$ 114 <sup>a</sup>	1796 $\pm$ 184 <sup>a</sup>	1766 $\pm$ 312 <sup>a</sup>	1387 $\pm$ 170 <sup>a</sup>
TRAP [ $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> ]	588 $\pm$ 10	528 $\pm$ 24	791 $\pm$ 49 <sup>a</sup>	1369 $\pm$ 203 <sup>a,b</sup>	384 $\pm$ 25 <sup>b</sup>
Kys. močová [mmol.l <sup>-1</sup> ]	70 $\pm$ 11	88 $\pm$ 9	123 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	174 $\pm$ 43 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 7 <sup>a,b</sup>

## 12 VLIV ALLOPURINOLU NA I/R POŠKOZENÍ TENKÉHO STŘEVA POTKANA A JEHO ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI *IN VITRO*

KATEŘINA MEJSTŘÍKOVÁ<sup>a</sup>, HANA ČÍŽOVÁ<sup>b</sup>,  
ANTONÍN LOJEK<sup>b</sup> a MILAN ČÍŽ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra srovnávací fyziologie a obecné zoologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>b</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Během ischemie a reperfuse (I/R) dochází ke konverzi enzymu xantin dehydrogenasy (XD) na xantin oxidasu (XO), která je vedle neutrofilů hlavním zdrojem reaktivních kyslíkových metabolitů (RKM) ve tkáních. Cílem práce bylo objasnit účast XO v I/R poškození tkání a účinek allopurinolu (analog hypoxantinu) jako inhibitoru XO, eventuálně jako přímého vychytávače radikálů.

Vliv allopurinolu na produkci RKM byl sledován na modelu I/R tenkého střeva. Ischemie byla navozena u laboratorních potkanů kmene Wistar (250–300 g) v celkové anestezii zaškrcením arteria mesenterica superior po dobu 45 minut. Skupina s indukovanou I/R byla rozdělena do 3 podskupin: a) bez aplikace allopurinolu, b) allopurinol podán intraperitoneálně, v jedné dávce 30 minut před zákrokem (50 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné hmotnosti) nebo c) allopurinol podáván v pitné vodě po dobu 1 týdne před zákrokem (8 mg/den). Vzorky krve a střevní mukózy byly odebrány po 2 hodinách reperfuse. V pokusu byly dále zahrnuty skupina intaktních kontrol a skupina s provedenou laparotomií bez indukce I/R (sham). Produkce RKM fagocyty v plné krvi (aktivovaná opsonizovaným zymosanem – OZP nebo forbol-myristát-acetát – PMA) a celková antioxidační kapacita plazmy (TRAP) byla měřena luminolem zesílenou chemiluminiscencí. Koncentrace kyseliny močové v séru byla stanovena spektrofotometricky. Výsledky jsou shrnuty v tabulce I. TRAP plazmy vysoce koreloval s koncentrací kyseliny močové ( $R = 0,78$ ).

V pokusech *in vitro* byla studována inhibice produkce superoxidového radikálu allopurinolem (0,1–50 mmol.l<sup>-1</sup>) v systémech XO (0,1 U.ml<sup>-1</sup>)/xantin (1,74 mg.ml<sup>-1</sup>) a XO/hypoxantin (1 mg.ml<sup>-1</sup>) a dále jeho schopnost přímého vychytávání peroxylových radikálů uvolňovaných pyrolýzou 2,2-azo-bis-(2-amidinopropane)hydrochloridu (400 mmol.l<sup>-1</sup>). Uvolňované RKM byly detekovány chemiluminiscenčně. Účinky allo-

## Tabulka II

Inhibice produkce superoxidového radikálu allopurinolem; data představují průměrné hodnoty  $\pm$  střední chybu průměru

Koncentrace allopurinolu	CL (% kontroly bez allopurinolu)	
	hypoxantin	xantin
0,1 mmol.l <sup>-1</sup>	76,7 $\pm$ 5,7	58,62 $\pm$ 1,8
1 mmol.l <sup>-1</sup>	55,83 $\pm$ 2,9	50,74 $\pm$ 1,4
10 mmol.l <sup>-1</sup>	14,43 $\pm$ 1,1	25,12 $\pm$ 2
25 mmol.l <sup>-1</sup>	9,17 $\pm$ 1,5	17,74 $\pm$ 0,7
50 mmol.l <sup>-1</sup>	5,55 $\pm$ 1	14,78 $\pm$ 0,4

purinolu na chemiluminiscenční signál generovaný systémem XO/xantin nebo XO/hypoxantin jsou uvedeny v tab. II. Allopurinol nevychytával peroxylový radikál.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 524/98/0190

## 13 OXIDATIVNÍ STRES U PACIENTŮ S PRAVIDELNOU HEMODIALÝZOU

LUKÁŠ KUBALA<sup>a,d</sup>, MILAN ČÍŽ<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR SOŠKA<sup>c</sup>, PAVEL STUDENÍK<sup>b</sup>,  
JAN ČERNÝ<sup>b</sup> a ANTONÍN LOJEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, <sup>b</sup>Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie, Pekařská 53, 656 91 Brno, <sup>c</sup>Fakultní nemocnice U Svaté Anny, Pekařská 53, 656 91 Brno, <sup>d</sup>Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie, Přírodovědecká Fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

V naší dřívější studii bylo zjištěno, že pacienti s chronickým selháním ledvin jsou vystaveni zvýšenému oxidativnímu stresu vyvolanému hemodialyzační (HD) procedurou<sup>1</sup>. Cílem této studie bylo dlouhodobě sledovat vliv HD na funkční vlastnosti a expresi povrchových molekul fagocytů, které patří k nejdůležitějším zdrojům reaktivních kyslíkových metabolitů (RKM), a na celkovou antioxidační kapacitu plazmy, která vypovídá o schopnosti organismu bránit se oxidativnímu poškození buněk a tkání.

Do studie bylo zahrnuto 43 pacientů, kteří byli sledováni po dobu dvou let. Pacientům byly odebírány vzorky krve před a po HD proceduře vždy jednou za 3 měsíce. Celková spontánní a aktivovaná tvorba RKM v plné krvi byla měřena luminolem zesílenou chemiluminiscencí. Jako aktivátory byly použity škrobová zrna, FMLP a opsonizovaný zymosan. Intracelulární produkce RKM byla detekována fluorescenčně dichlorofluoresceinem a hydroethidinem na flowcytometru. Celková antioxidační kapacita plazmy (TRAP) byla stanovována chemiluminiscenční metodou<sup>2</sup>. Immunofluorescenčně byla sledována změna exprese CD11b/CD18 (MAC-1) a CD62L (L-selektinu) na flowcytometru.

Spontánní i aktivovaná celková tvorba RKM detekovaná chemiluminiscenčně byla u pacientů po HD proceduře významně snížena. Tento pokles byl potvrzen snížením intracelulární produkce RKM detekované fluorescenčně.

Hodnoty TRAP byly u pacientů před HD významně zvýšeny oproti kontrolním hodnotám získaným od zdravých jedinců. Po HD proceduře se hodnoty TRAP významně snížily, dokonce pod úroveň kontrolních hodnot.

Expresce CD11b/CD18 se po HD proceduře zvýšila jak na neutrofilních granulocytech tak na monocytech. Expresce CD62L se významně neměnila.

Studie prokázala zvýšený oxidativní stres u pacientů s pravidelnou HD. Zatímco výsledky monitorující úlohu krevních fagocytů jsou kontroverzní (zvýšení exprese CD11b/CD18 oproti snížení chemiluminiscenční aktivity), významné snížení celkové antioxidační kapacity plazmy po HD až pod úroveň kontrolních hodnot svědčí o nedostatečnosti vlastních antioxidačních mechanismů a nutnosti jejich podpory vhodným terapeutickým zásahem.

*Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ 4796-3.*

## LITERATURA

1. Soška V., Lojek A., Sobotová D.: *Klin. Biochem. Metab.* 3, 256 (1995).
2. Slavíková H., Lojek A., Hamar J., Dušková M., Kubala L., Vondráček J., Číž M.: *Free Rad. Biol. Med.* 25, 9 (1998).

## 14 PODÍL GLYKOXIDACE NA PROGRESI DIABETICKÝCH KOMPLIKACÍ

IVANA MÁROVÁ<sup>a</sup>, KATEŘINA KAŇKOVÁ<sup>b</sup>,  
JIŘÍ ZÁHEJSKÝ<sup>c</sup> a KATEŘINA PĚNČÍKOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie potravin a biotechnologií, Chemická fakulta VUT, Purkyňova 118, 612 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta MU, Kamenice 3, 628 00 Brno, <sup>c</sup>Dermatovenerologická klinika FN U sv. Anny, Pekařská 53, 656 91 Brno

Diabetes mellitus je spojen s výskytem specifických pozdních komplikací (mikro- a makroangiopatie, retinopatie, neuropatie, nefropatie), na jejichž rozvoji se více či méně podílí poruchy vaskulárního systému. Za primární příčinu progresu

komplikací je považována dlouhodobá hyperglykémie. Molekulární základ uvedených změn spočívá mimo jiné v kovalentní modifikaci extracelulárních i intracelulárních proteinů neenzymovou glykací za vzniku AGE a s tím spojeným zvýšeným oxidačním stresem<sup>1</sup>.

Neenzymová glykace, jež se podílí i na chemismu biologického stárnutí, probíhá nespecificky ve všech tkáních organismu a její podstatou je spontánní vazba glukózy na proteiny. V průběhu časné a reverzibilní fáze dochází ke vzniku Amadoriho produktů, které v následující pozdní fázi podléhají pomalému sledu chemických přeměn za vzniku ireverzibilních pozdních produktů glykace (AGE). Patogenetický význam AGE spočívá v jejich značné reaktivitě a schopnosti vytvářet příčné vazby mezi proteiny, což vede k jejich zvýšené rezistenci k proteolýze a následné akumulaci ve tkáních<sup>2</sup>. V průběhu glykačních reakcí dochází i k tvorbě reaktivních kyslíkových intermediátů (ROI), jež mohou působit jako signální molekuly a indukovat alterace buněčných funkcí. Účinky AGE i ROI mohou interferovat s genovou expresí peptidů a cytokinů regulujících buněčnou proliferaci a vaskulární funkce<sup>2</sup>.

Rozhodujícím procesem při udržení normální homeostasy ve stárnoucích a lokálně poškozených tkáních je regulace přeměny buněk a proteinů extracelulární matrix. Zde hraje významnou úlohu specifický AGE-receptor (RAGE) objevený na povrchu monocytů/makrofágů, endotheliálních buněk a buněk hladkého svalstva<sup>3</sup>. Vazba AGE-RAGE je následována sérií intracelulárních modifikací, které mohou sloužit k mnoha účelům, např. k odstranění starých a poškozených molekul, k iniciaci opravy tkání a k regulaci obratu proteinů. Negativním dopadem interakce AGE-RAGE je zvýšený oxidační stres následovaný vaskulární dysfunkcí, zvýšená vaskulární permeabilita, exprese adhezivních molekul, cytokinů a růstových faktorů, chemotaxe, zvýšení syntézy extracelulární matrix a trombogenity. Vychytávání AGE-modifikovaných proteinů a buněk makrofágy vede ke vzniku malých reaktivních AGE-peptidů, které slouží jako „druhá generace“ schopna další vazby na proteiny a modifikace tkání<sup>4</sup>. Tvorba AGE a oxidační stres jsou vzájemně související procesy a jejich kombinace se zřejmě zásadně podílí na rozvoji diabetických pozdních komplikací. Dalším důležitým faktorem je genetická predispozice, přičemž jedním z kandidátních genů zapojených v regulaci progresu komplikací je gen pro RAGE (cit.<sup>5</sup>).

AGE-struktury byly nalezeny rovněž v horních vrstvách epidermis, ve zvýšené míře u diabetiků a starších jedinců<sup>6</sup>. Kožní projevy se vyskytují u převážné většiny diabetiků a je pravděpodobné, že jsou z velké části založeny na glykooxidálních změnách strukturních proteinů kožního povrchu (kolagen, keratin). Kůže je vhodný modelový orgán ke studiu diabetických komplikací, poněvadž jde o orgán dostatečně velký, velmi dobře vyšetřitelný, dostatečně vaskularizovaný, s možností neinvazivního odběru vzorků. V předloženém příspěvku budou diskutovány dílčí výsledky získané v rámci asociační studie zaměřené na souvislost rozvoje diabetických kožních komplikací s výskytem polymorfismů u vybraných kandidátních genů.

V rámci studie bylo provedeno kompletní klinické laboratorní a genetické vyšetření souboru 422 pacientů rozdělených do skupin podle výskytu diabetu II. typu, resp. diabetických kožních komplikací. Klinicky diagnostikované projevy pozdních komplikací byly vyjádřeny pomocí semikvantitativního

indexu. Jako parametry glykace byly sledovány hladiny Amadoriho produktů v séru (HbA1c) a v kůži a hladiny AGE v kůži a jako parametry monitorující antioxidantní stav hladiny  $\alpha$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokoferolu a karotenoidů (lutein, lykopen,  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten) v séru. Souběžně byla prováděna analýza RAGE genu a sledována souvislost nalezených polymorfismů s klinickými i laboratorními parametry.

Průměrné hladiny AGE nalezené v kůži diabetiků se signifikantně nelišily od hladiny AGE v kůži nediabetiků s mikroangiopatií. Nebyla rovněž zjištěna korelace klinického indexu s AGE, na rozdíl od jeho signifikantní korelace s hladinami všech stanovovaných antioxidantů. Zjištěné polymorfismy RAGE genu nesouvisely s hladinou glykačních produktů ale opět byla prokázána asociace genotypu RAGE (intronové polymorfismy) s hladinami antioxidantů v plazmě. Na rozvoji vaskulárních komplikací se podílí více mechanismů, z nichž zásadní význam má zřejmě schopnost organismu udržovat rovnováhu oxidačních a antioxidantních procesů ve tkáních.

*Tato práce byla podpořena grantem VŠ 96-097 MŠMT.*

## LITERATURA

1. Baynes J. W., Thorpe S. R.: *Diabetes* 48, 1 (1999).
2. Brownlee M., Cerami A., Vlassara H.: *New Engl. J. Med.* 318, 1315 (1988).
3. Schmidt A. M., Hori O., Cao R., et al.: *Diabetes* 45 (Suppl. 3), 77 (1996).
4. Mohamed A. K., Bierhaus A., et al.: *Biofactors* 10, 157 (1999).
5. Kaňková K., Vašků A., Hájek D., Záhejský J., Vašků V.: *Diabetes Care* 22, 1745 (1999).
6. Márová I., Záhejský J., Sehnalová H.: *Acta Diabetol.* 32, 38 (1995).

## 15 VLIV AKUTNÍ METHIONINOVÉ ZÁTĚŽE NA OXIDOVATELNOST LIPOPROTEINŮ

ALEŠ ŽÁK<sup>a,c</sup>, MARTA BUCHTÍKOVÁ<sup>a</sup>, SEVERYN ROMANIV<sup>a</sup>, ALEXANDRA PÍSAŘÍKOVÁ<sup>a</sup>, STANISLAV ŠTÍPEK<sup>b</sup>, TOMÁŠ ZIMA<sup>c</sup> a MIROSLAV ZEMAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IV. Interní klinika 1. LF UK Praha, U nemocnice 2, 128 08 Praha, <sup>b</sup>1. Ústav lékařské chemie a biochemie 1. LF UK Praha, Kateřinská 32, 120 00 Praha, <sup>c</sup>Ústav klinické biochemie VFN Praha, Karlovo n. 32, 120 00 Praha

Zvýšená koncentrace celkového homocysteinu (tHcy) v plazmě se považuje za nezávislý rizikový faktor ischemické choroby srdeční (ICHS) a dalších klinických projevů aterosklerózy<sup>1</sup>. Předpokládá se, že vzestup tHcy o 5,0  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  zvyšuje riziko ICHS stejnou měrou jako vzestup celkového cholesterolu o 0,5  $\text{mmol.l}^{-1}$  (cit.<sup>2</sup>). Urychlení aterosklerózy v důsledku zvýšení koncentrace tHcy je zřejmě multifaktoriální a jednotlivé mechanismy tohoto procesu nejsou dosud přesně známy. Homocystein (Hcy), jako další thioley, je schopen při autooxidaci generovat řadu reaktivních kyslíkových substancí ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ), které mohou iniciovat peroxidaci lipidů<sup>3</sup>. Předpokládá se, že oxidativní modifikace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), ke které dochází během lipoperoxidace, hraje významnou roli v časných stádiích aterosklerózy<sup>4</sup>. Výsledky řady studií, zabývajících se vlivem Hcy na peroxidaci lipoproteinů *in vitro* však nejsou jednotné<sup>5</sup>. Cílem této studie bylo zjistit vliv hyperhomocysteinémie (hHcy), indukované zátěží methioninem (Met) per os na některé parametry lipoperoxidace.

Vyšetřená skupina (15 mužů/8 žen) sestávala z 8 zdravých osob, 9 pacientů s aterosklerotickými komplikacemi a 6 nemocných se smíšenou hyperlipidémií. Průměrný věk skupiny byl  $53,7 \pm 16,0$  let (průměr  $\pm$ SD) a hmotnostní index  $26,6 \pm 3,7$  ( $\text{kg.m}^{-2}$ ). Před a během studie neužívali pacienti žádné léky, které ovlivňují metabolismus Hcy a oxidační stres<sup>3</sup>. Krev byla odebrána do EDTA ( $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), do 60 min po odběru byla separována plazma ( $3000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Bazální (0 hod) i pozátěžové koncentrace tHcy (6 hod;  $0,1 \text{ g}$

Tabulka I

Bazální a pozátěžové koncentrace celkového plazmatického homocysteinu a parametrů lipoperoxidace

	Před zátěží (0 hod)	Po zátěži (6 hod) <sup>a</sup>
Celkový homocystein [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$15,4 \pm 7,7^b$	$39,6 \pm 15,8^{c,g}$
LDL – konjugované dieny [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$280,4 \pm 92,3$	$299,4 \pm 120,4^c$
VLDL – konjugované dieny [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$220,3 \pm 103,2$	$249,8 \pm 97,8$
LDL – bazální absorbance [ $A_{234\text{nm}}^h$ ]	$0,281 \pm 0,113$	$0,303 \pm 0,123$
LDL – lag fáze [min] <sup>h</sup>	$62,8 \pm 11,9$	$57,3 \pm 12,5^c$
LDL – fáze propagace [ $\delta A_{234\text{nm}} \text{min}^{-1}$ ] <sup>h</sup>	$0,0267 \pm 0,005$	$0,0280 \pm 0,006^d$
VLDL – bazální absorbance [ $A_{234\text{nm}}^i$ ]	$0,265 \pm 0,082$	$0,378 \pm 0,106$
VLDL – lag fáze [min] <sup>i</sup>	$207,4 \pm 39,5$	$192,7 \pm 25,3$
VLDL – fáze propagace [ $\delta A_{234\text{nm}} \text{min}^{-1}$ ] <sup>i</sup>	$0,007 \pm 0,002$	$0,010 \pm 0,003^d$
Relativní pohyblivost LDL <sup>j</sup>	$5,83 \pm 1,45$	$6,91 \pm 1,55^f$

<sup>a</sup> Methionin  $0,1 \text{ g/kg}$  těl. hmotnosti; <sup>b</sup> hodnoty představují průměr  $\pm$ SD; <sup>c</sup> párový t-test (resp. Mannův-Whitneyův test); <sup>d</sup>  $p < 0,10$ ; <sup>e</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>f</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>g</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>h</sup> LDL (<sup>i</sup> VLDL) adjustovány na koncentrace proteinu  $0,50$  (resp.  $0,25$ )  $\text{g.l}^{-1}$ ; <sup>j</sup> poměr pohyblivosti LDL po 6 hodinové inkubaci *in vitro* ku pohyblivosti LDL před inkubací



Met/kg těl. hm.) byly stanoveny HPLC s fluorescenční detekcí<sup>6</sup>. Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL, 16 hod, 112 000× g, d = 1,006 g.ml<sup>-1</sup>) a LDL (20 hod, 112 000× g, d = 1,063 g.ml<sup>-1</sup>) byly separovány sekvenční ultracentrifugací (Beckman L-55 M, Al rotor 40.3)<sup>7</sup>. Koncentrace konjugovaných dienu (KD) v LDL, které odrážejí koncentraci minimálně modifikovaných (mm)LDL byly stanoveny spektrofotometricky (A<sub>234nm</sub>) v nedialyzovaných LDL. Koncentrace proteinu ve VLDL a LDL byla stanovena modifikací Lowryho metody<sup>8</sup>. Lipoperoxidace LDL a VLDL byla zjišťována stanovením kinetiky KD po iniciaci ionty Cu<sup>2+</sup> metodou podle Esterbauer<sup>9</sup>. Elektroforesa lipoproteinů byla provedena před inkubací frakce LDL (čas 0) a po inkubaci *in vitro* (37,0 °C; Cu<sup>2+</sup> 50 μM; pH 7,4) na agaróze [Hydragel Lipoprotein + Lp(a), (Sebia)]. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí BMDP Statistical Software. Basální a pozátěžové koncentrace tHcy a některé markery lipoperoxidace jsou uvedeny v tabulce I.

Mírná hHcy, indukovaná akutní Met zátěží, zvyšuje koncentrace KD v LDL, které implikují zvýšenou koncentraci mm-LDL. Zkrácení lag fáze LDL a zvýšení relativní pohyblivosti LDL po inkubaci s ionty Cu<sup>2+</sup>, ke kterým došlo po Met zátěži, svědčí pro zvýšení oxidability částic LDL v důsledku mírné hHcy, která také hraničně urychluje rychlost oxidace LDL a VLDL. Tyto nálezy jsou v souladu s prooxidační účinky akutní hHcy *in vivo*, zjištěnými některými autory<sup>10</sup>.

#### LITERATURA

1. McCully K. S.: Ann. Clin. Lab. Sci. 23, 477 (1993).
2. Stamfer M. J., Malinow M. R., Willett W. C., et al.: JAMA 268, 877 (1992).
3. Selhub J.: Annu. Rev. Nutr. 19, 217 (1999).
4. Heinecke J. W.: Curr. Opin. Lipidol. 8, 268 (1997).
5. Halvorsen B., Brude I., Drevon. C. A., et al.: J. Lipid Res. 37, 591 (1996).
6. Araki A., Sako Y.: J. Chromatogr. 422, 43 (1987).
7. Schumacker V. N., Puppione D. I., v: *Methods in Enzymology* (Segrest J. P., Albers J. J., ed.), str. 155. Academic Press, Orlando 1986.
8. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., et al.: Anal. Biochem. 87, 206 (1978).
9. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., et al.: Free Rad. Res. Commun. 6, 67 (1989).
10. Ventura P., Panini R., Verlatto C., et al.: Metabolism 49, 225 (2000).

#### 16 VPLYV REZORCYLIDÉNAMINO Guanidínu NA ANTIOXIDAČNÝ STAV POTKANOV S DIABETES MELLITUS

ANNA LIPTÁKOVÁ<sup>a</sup>, OLGA ULIČNÁ<sup>b</sup>,  
ZDENA ĎURAČKOVÁ<sup>a</sup> a JOZEF ČÁRSKY<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie,  
<sup>b</sup>Farmakobiochem. lab. III. internej kliniky, LF UK Bratislava,  
Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika

Diabetes mellitus (DM) je chronické metabolické ochorenie, charakterizované stratou homeostázy glukózy. Glukóza môže priamo alebo nepriamo prispievať ku generovaniu voľ-

ných radikálov (VR) a následne viesť ku vzniku oxidačného stresu. Zvýšená tvorba VR pri DM môže byť rizikovým faktorom tohoto ochorenia. Nastáva v dôsledku: *i*) zníženej aktivity antioxidačných systémov v organizme<sup>1</sup>, *ii*) autooxidácie redukujúcich sacharidov a tvorby aduktov s proteínmi. V týchto reakciách majú význam procesy glykácie, glykooxidácie a tvorby produktov pokročilej glykácie (AGE produkty)<sup>2</sup>. Známym inhibítorom týchto procesov je aminoguanidín (AG). Predpokladá sa, že pôsobí mechanizmom jednak antioxidačným a jednak blokovaním reaktívnych oxo-skupín a vychytávania dikarboxylových intermadiátov, ktoré vznikajú v glyko-oxidačných procesoch. Tým bráni pokračovaniu následných dejov, výsledkom ktorých je tvorba AGE produktov. Nevýhodou AG sú jeho toxické prejavy a prooxidačný efekt. Preto sa skúmal biologický účinok jeho Schiffovej zásady – rezorcylidénaminoguanidínu (RAG)<sup>3</sup>. Sú známe jeho antimutagénne a bakteriostatické aktivity. Chelátotvorné vlastnosti RAGu sa môžu uplatniť pri väzbe iónov prechodných kovov, katalyzujúcich glyko-oxidačné deje a tvorbu VR. Mechanizmus účinku RAGu nie je presne známy. Vie sa, že znižuje tvorbu AGE, o ktorých sa predpokladá, že by sa mohli zúčastňovať postdiabetických komplikácií. V experimentoch *in vitro* sa potvrdila aj antioxidačná schopnosť RAGu.

Cieľom práce bolo zistiť vplyv podávania RAGu potkanom s experimentálne vyvolaným inzulínne nezávislým DM na hladiny antioxidantov v plazme a v homogénate pečene.

Na pokusy sme použili potkany kmeňa Wistar. Potkany sme rozdelili do štyroch skupín. 1) Kontrolná skupina (K) – zdravé zvieratá. 2) Zvieratá, ktorým sme podávali sondou do žalúdka RAG (10 mg.kg<sup>-1</sup> 1× denne) (RAG). 3) Zvieratá s vyvolaným DM (streptozotocín 45 mg.kg<sup>-1</sup>) (DM). 4) Zvieratá s vyvolaným DM, ktorým sme podávali RAG 10 mg.kg<sup>-1</sup> (DM-RAG). Obom skupinám s DM sme podávali inzulín (MONO ID v dávke 12 U.kg<sup>-1</sup> počas 8 týždňov).

V krvi sme stanovili koncentráciu glukózy, cholesterolu a triacylglycerolov štandardnými metódami. V pečeni sme stanovili cholesterol a triacylglyceroly. V plazme a homogénate pečene sme stanovili chemiluminiscenčnou metódou antioxidanty rozpustné vo vode (ACW) a v lipidoch (ACL) (cit.<sup>4</sup>). Koncentrácie antioxidantov rozpustných vo vode a v lipidoch sú uvedené v tabuľke I.

Tabuľka I  
Antioxidanty rozpustné vo vode a v lipidoch

Parameter	K	RAG	DM	DM-RAG
Plazma-ACW [μmol troloxu/l]	29,93	22,47	22,79	23,16
Plazma-ACL [μmol troloxu/l]	47,21	47,48	52,75	49,67
Pečeň-ACW [μmol troloxu/g P]	40,35	40,41	29,56	29,34
Pečeň-ACL [μmol troloxu/g P]	10,54	10,72	10,21	10,68

Výsledky ukazujú, že v krvi potkanov s DM je výrazne zvýšená hladina glukózy, cholesterolu a v krvi a pečeni triacylglycerolov. Hladina ACL v plazme diabetických potkanov je

hranične zvýšená, čo môže súvisieť s indukciou týchto antioxidantov vzhľadom na zvýšený antioxidačný stres. Hladiny ACW u diabetických potkanov sú znížené, čo poukazuje na ich vyčerpanie v plazme aj v pečeni. Z výsledkov vyplýva, že jednotlivé antioxidanty nereagujú rovnako na oxidačnú záťaž, čo je pravdepodobne dané charakterom tvorených oxidantov.

RAG podávaný diabetickým potkanom významne neovplyvnil hladiny ACL v plazme a v pečeni a ani ACW v plazme. Zo získaných výsledkov vyplýva, že RAG podávaný *in vivo* významne neuplatňuje antioxidačné vlastnosti.

*Táto práca bola podporená grantami MŠ SR č. 1/5158/98 a č. 1/6145/99.*

#### LITERATÚRA

- Muchová J., Liptáková A., Országhová Z., Garaiová I., Tisoň P., Čársky J., Ďuračková Z.: *Diabetic Medicine* 16, 74 (1999).
- Čársky J., v: *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (II)* (Ďuračková Z., Bergendi L., Čársky J., ed.). SAP, Bratislava 1999.
- Čársky J., Lazarová M., Beňo A.: *Acta F.R.N. Univ. Comen.-Chimia XXVI*, 89 (1978).
- Popov I. N., Lewin G.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 31, 1 (1996).

#### 17 VPLYV DERIVÁTU AMINO GUANIDÍNU NA OXIDOVATEĽNOSŤ LIPOPROTEÍNOV U MODELOVÉHO DIABETES MELLITUS

PETER KORYTÁR<sup>a</sup>, OLGA ULIČNÁ<sup>b</sup>,  
MARIANNA MOLNÁROVÁ<sup>a</sup>, MONIKA SIVOŇOVÁ<sup>a</sup>,  
JOZEF ČÁRSKY<sup>a</sup> a ZDENA ĎURAČKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, <sup>b</sup>Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky, LF UK, Hlboká 7, 811 05 Bratislava, Slovenská republika

Medou vyvolaná oxidácia lipoproteínov v nefrakciovannej plazme sa používa ako *in vitro* model pre štúdium schopnosti lipoproteínov odolávať oxidácii. Pôsobením voľných radikálov na vyššie nenasýtené karboxylové kyseliny lipoproteínov dochádza k ich oxidácii za tvorby konjugovaných diénov<sup>1,3</sup>, ktoré absorbujú UV svetlo pri 245 nm.

Na sledovanie odolnosti lipoproteínov voči oxidácii indukovanej iónmi Cu<sup>2+</sup> sa použili plazmy zdravých krýs, diabetických krýs, u ktorých sa diabetes vyvolal streptozotocínom, plazmy diabetických krýs s aplikovaným 2,5-dihydroxybenzylidén-aminoguanidínom (BAG) a plazmy zdravých krýs a diabetických krýs, ktorým sa podával BAG. BAG je derivát aminoguanidínu. Pre niektoré svoje toxické prejavy a možný prooxidačný efekt je aminoguanidín z hľadiska terapeutického využitia nevhodný. Preto sa skúmajú možnosti uplatnenia jeho derivátov, medzi ktoré patrí aj BAG, u ktorého sa predpokladajú antioxidačné účinky. Má tiež veľkú afinitu k dikarboxylovým intermediátom, ktoré vznikajú v glykooxidačných procesoch. Tým bráni pokračovaniu následných dejov, ktorých výsledkom sú produkty pokročilej glykácie. Týmto pôsobí preventívne vo vývoji chronických diabetických komplikácií.

Okrem týchto efektov inhibuje aktivitu aminooxidázy a NO-syntázy, ktoré môžu aktivovať vaskulárne a neurálne procesy<sup>2</sup>.

Kinetiku oxidácie lipidov vyjadruje krivka, ktorú možno charakterizovať rôznymi parametrami: smernica dotyčnice krivky vystihuje kinetickú závislosť oxidácie lipidov a rýchlosť tvorby konjugovaných diénov. Ďalším parametrom je čas začiatku oxidácie. Výsledky sme vyhodnotili štatisticky pomocou Studentovho t-testu.

Zistili sme, že BAG významne inhibuje oxidáciu lipoproteínov u skupiny diabetických krýs (tab. I). Na druhej strane sa však prejavil aj jeho toxický efekt na kontrolnú skupinu, u ktorej čiastočne oxidovateľnosť lipidov potencoval. Z toho dôvodu je potrebné v budúcnosti pripraviť ďalšie deriváty aminoguanidínu, s cieľom zvýšiť ich anti-diabetickú aktivitu a súčasne zmenšiť toxicitu voči zdravým jedincom.

#### Tabuľka I

Priemerné hodnoty parametrov, ktoré charakterizujú oxidáciu lipoproteínov v plazme krýs jednotlivých skupín

	Priemer ±SEM		
	smernica dotyčnice [10 <sup>-6</sup> A.s <sup>-1</sup> ]	čas [s]	
		t	t <sub>0</sub>
K	8,30±0,958	1710±97,80	2040±87
DIA	13,85±1,350	1236±82,20	1602±82,8
K+BAG	11,20±0,685	1434±143,4	1746±175,8
DIA+BAG	10,37±0,683	1716±135,0	2172±89,4

*Prácu čiastočne finančne podporila grantová agentúra VEGA MŠ SR, granty 1/5158/98 a 1/6145/99.*

#### LITERATÚRA

- Ďuračková Z.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. Slovak Academic Press, Bratislava 1998.
- Ďuračková Z., Bergendi L., Čársky J.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (II): Význam voľných radikálov v etiológii niektorých ochorení*. Slovak Academic Press, Bratislava 1999.
- Schnitzer E., Pinchuk I., Bor A., Fainaru M., Samuni A. M., Lichtenberg D.: *Chem. Phys. Lipids* 42, 151 (1998).

#### 18 SLEDOVÁNÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY U STUDENTŮ KUŘÁKŮ A U PACIENTŮ S HYPERLIPOPROTEINEMII

JOSEF POVA<sup>a</sup>, LUDEK ŠPRONGL<sup>a</sup>, JANA ČEPOVÁ<sup>a</sup>,  
KAREL DOHNAL<sup>b</sup> a RICHARD PRŮŠA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, V Úvalu 84, 150 00 Praha 5, <sup>b</sup>Ústav veřejného zdravotnictví a preventivního lékařství 2. lékařské fakulty UK, V Úvalu 84, 150 00 Praha 5

Volné kyslíkové radikály iniciují četné biochemické reakce a ovlivňují jejich rychlost a směr. Vedle fyziologického účinku se volné radikály podílejí také na patogenezi celé skupiny onemocnění, především interakcí s molekulami pro-

teinů a mastných kyselin biologických membrán. Vzhledem ke krátkému poločasů volných radikálů v organismu, je jejich detekce v klinické praxi velmi obtížná. Jejich škodlivý účinek na tkáň je v organismu eliminován antioxidačními systémy. Proto je možno poruchu navozenou účinkem volných radikálů diagnostikovat a monitorovat na základě kvantifikace komponent tohoto systému. Jednou z metod je stanovení celkové antioxidační kapacity (AOC), která slouží k posouzení schopnosti organismu bránit se oxidačnímu stresu, jehož důsledkem je poškození biomolekul a tkání. Monitorování AOC u konkrétních pacientů umožňuje vhodně terapeuticky zasáhnout, např. podat adekvátní suplementaci antioxidačními přípravky. Cílem studie bylo posoudit celkovou antioxidační kapacitu u skupin osob s předpokládaným vyšším stupněm zátěže volnými kyslíkovými radikály.

První skupinu tvořili studenti 2. lékařské fakulty v Praze ( $n = 48$ , věk 19 až 27 let). Všichni byli kuřáci účastníci se mezinárodní soutěže pro kuřáky Přestaň a vyhraž 2000 (Státní zdravotní ústav). Po jednoměsíční dobrovolné abstinenci cigaret bylo AOC měřeno znovu a hodnoty porovnány s obdobím před abstinencí. Kromě vlivu kouření na AOC byla posouzena i její hladina ve vztahu k chronickému intermitentnímu stresu, kterému je tato skupina vystavována během studia. Druhý soubor tvořili pacienti ambulantně léčení pro hyperlipoproteinemii v lipidové poradně ( $n = 28$ , 14–72 let).

K měření byl použit komerční set Total antioxidant status (Randox, Velká Británie). Princip metody: ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfát]) je inkubován s peroxidasou (metmyoglobin) a peroxidem vodíku. Výsledkem této reakce je radikál ABTS modrozelené barvy. Přidané antioxidanty ve sledovaném vzorku snižují jeho koncentraci a pokles intenzity zabarvení odpovídá hladině AOC vyšetřovaného vzorku, měření absorbance při vlnové délce 600 nm. Referenční rozmezí AOC pro sérum udávané výrobcem je 1,30–1,77 mmol.l<sup>-1</sup>. Vzorky byly měřeny na analyzátoru ADVIA 1650 (Bayer, USA).

Průměrná hodnota AOC byla u sledované skupiny studentů 1,49 mmol.l<sup>-1</sup>, SD 0,17 mmol.l<sup>-1</sup>. 17 % studentů mělo naměřenou hodnotu AOC pod dolní referenční mezí. Průměrná hodnota AOC pacientů s hyperlipoproteinémií byla 1,50 mmol.l<sup>-1</sup>, SD 0,12 mmol.l<sup>-1</sup> a 7 % těchto pacientů mělo naměřenou hodnotu AOC pod dolní referenční mezí.

*Tato práce byla podpořena grantem Výzkumný záměr číslo 111300003.*

## 19 THE ESTIMATION OF FREE RADICALS USING THE DIRECT METHOD IN SERUM OF PATIENTS WITH VARIOUS DISORDERS OF LIPID METABOLISM

MILOŠ VOTRUBA<sup>a</sup>, PAVEL STOPKA<sup>b</sup>, JANA HROUDOVÁ<sup>c</sup>, and MARTA HRBKOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mi-Vo-La, Hostýnská 516, 108 00 Praha 10, <sup>b</sup>Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež u Prahy, <sup>c</sup>AeskuLab Ltd, Pod Marjánkou, 160 00 Praha 6

The current state of free radical (FR) assesment from blood can be characterized by series of indirect methods detecting alterations as a result of pathological FR activity. In this study

we have adopted the method based on the ability of chlorophyllin to play a role of electron donor or acceptor. This property of chlorophyllin has been exploited in the past in other areas of chemistry too. We have used this method for studies of various types of lipid changes connected with atherosclerosis or diabetes with atherosclerotic symptoms.

The results of our FR assay in different types of lipid metabolism disorders are summarized in Table I. In the group (G1) of probands with high cholesterol values and especially in those, having the high level of LDL-CH, we found relatively high levels of FR. After treatment by high doses of antioxidants in the form of special types of nutritional supplements we observed a decrease in both total-CH and LDL-CH concentrations. These changes occurred within a short time (4–6 weeks). No statistically significant changes in HDL-CH fraction were found during the time of antioxidant treatment. In the group of patients, characterized by middle elevated triacylglycerols and high cholesterol values the results were similar to group G 1, but the values of FR were on average lower.

The group of persons, mostly diabetics, having a high concentration of triacylglycerols but physiological or middle elevated values of cholesterol, differs from both above mentioned groups by a large variability in FR concentrations. Practically no relationship of FR levels to lipid values was observed and the high or low values of FR were found both in patients with very high or only middle elevated triacylglycerol concentrations. Additionally we found that FR values correspond to the degree of glycation, expressed as glucose levels, or/and glycated haemoglobin values.

The physiological concentration of free radicals is indispensable for the first-step protection by reactions such as activation of neutrophils, respiratory chain, phagocytosis, prostaglandin synthesis, nonenzymatic reaction of oxygen, cytochrome P-450 system etc. Apart from this positive role FR unfortunately play a the very negative role too, especially if the equilibrium between FR concentration and total capacity of antioxidants in living system is damaged and the FR- level becomes significantly higher than the concentration of all antioxidants present in the system. The increase of FR in these cases we express by the form of per cent of elevation from the level of 100 %.

Table I

Free radical levels in probands with different type of lipid metabolism disorders

Group	Parameters	Values	Statistical significance
G 1	total cholesterol	8,40±1,22 mmol.l <sup>-1</sup>	p<0,005
	triacylglycerols	1,88±0,44 mmol.l <sup>-1</sup>	
	free radicals	134±18 per cent	
G 2	total cholesterol	7,02±1,77 mmol.l <sup>-1</sup>	p<0,01
	triacylglycerols	2,35±0,88 mmol.l <sup>-1</sup>	
	free radicals	122±8 per cent	
G 3	total cholesterol	5,54±1,38 mmol.l <sup>-1</sup>	N.S. r = 0,922 p<0,001 r = 0,941
	triacylglycerols	3,65±1,44 mmol.l <sup>-1</sup>	
	free radicals	121±38 per cent	
	glucose	7,66±1,21 mmol.l <sup>-1</sup>	
	glyc. haemoglob.	4,06±0,95 per cent	

In conclusion, increased values of FR were found in all cases of lipid metabolism disturbances. The elevated values of FR are statistically significant in those probands showing high cholesterol, glucose and glycated haemoglobin levels. FR levels correlate with glucose and glycated haemoglobin values.

## 20 TOTAL ANTIOXIDANT STATUS OF HUMAN PLASMA CORRELATES WITH CONCENTRATION OF URIC ACID ANALYZED BY ION-PAIRED HPLC

TOMÁŠ SCHEINER, JIŘÍ SUTTNAR,  
VĚRA ŠORELOVÁ, LEONA MÁŠOVÁ,  
and JAN EVANGELISTA DYR

*Institute of Hematology and Blood Transfusion, U nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic*

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a variety of normal biological reactions. Biology and medicine reflect evidence of the importance of ROS in the aging process and the pathogenesis of many diseases, e.g., cancer, atherosclerosis, immune-system decline<sup>1</sup>. To counteract ROS and to prevent their possible damage to biological molecules, all oxygen-consuming organisms are endowed with well-integrated antioxidant systems. The number of different antioxidant components in blood plasma/serum makes it rather difficult to measure each antioxidant component separately. Therefore, several methods have been developed to evaluate the total antioxidant capacity of biological samples.

We adopted two methods for total antioxidant status (TAS) of human plasma based on *a*) absorbance of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) quenched by antioxidants in a system<sup>2</sup>, *b*) bleaching of carotenoid crocin by peroxy radicals<sup>3</sup> generated during thermal decomposition (37 °C) of 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP). Both methods were adopted to 96 well microplates. For uric acid and vitamin C analysis we adopted the method of Ross<sup>4</sup>. The column was Lichrosorb C18, 250×4 mm, 5 µm (LKB, Bromma, Sweden), operated isocratically at 35 °C with flow-rate of 0.6 ml.min<sup>-1</sup> and with UV detection at 262 nm. The mobile phase was 60 mM acetic acid, 30 mM myristyltrimethyl-ammonium bromide, pH 5.5 (with NaOH), 5 % (v/v) acetonitrile. Homocysteine at 100 mg.l<sup>-1</sup> and EDTA at 200 mg.l<sup>-1</sup> were added immediately before use. The proteins in plasma samples were precipitated using metaphosphoric acid, and after centrifugation, 10 µl of supernatant was injected onto column. We observed unstable baseline at uric acid position and unreproducible retention times and distorted peaks for vitamin C. The results were improved using perchloric acid deproteinization with subsequent neutralization with potassium carbonate by adjustment of pH to around 5.0. Both with the method *a*), evaluated by "lag-phase" estimation, and with the method *b*) we found fairly good correlation of uric acid concentration with TAS. Even better was the correlation of TAS with the sum of Trolox equivalents of individual blood plasma antioxidants (uric acid, ascorbic acid, α-tocopherol, and retinol).

*This work was supported by grants from IGA MZ ČR: 4809-3 and NK/4956-3.*

## REFERENCES

1. Stadtman E. R., Berlett B. S.: *Drug Metabol. Rev.* 30, 225 (1998).
2. Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A.: *Clin. Sci.* 84, 407 (1993).
3. Lissignoli S., Fraccaroli M., Andrioli G., Brocco G., Bellavite P.: *Anal. Biochem.* 269, 38 (1999).
4. Ross M. A.: *J. Chromatogr.* 657, 197 (1994).

## 21 PRODUCTION OF MALONDIALDEHYDE AND THROMBOXANE A<sub>2</sub> IN BLOOD PLATELETS STIMULATED BY THROMBIN AND THROMBIN RECEPTOR ACTIVATING PEPTIDE

LEONA MÁŠOVÁ, JIŘÍ SUTTNAR,  
and JAN E. DYR

*Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague, Czech Republic*

It is known that malondialdehyd (MDA) and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) are produced after stimulation of blood platelets by thrombin. In human blood platelets, arachidonic acid (AA) is transformed into prostaglandin endoperoxides PGG<sub>2</sub> and PGH<sub>2</sub>, which are then converted into TXA<sub>2</sub> that rapidly hydrolyzes into TXB<sub>2</sub>. Several authors have demonstrated the enzymatic conversion of PGH<sub>2</sub> into approximately equimolar amounts of TXB<sub>2</sub> and MDA (Ref.<sup>1</sup>). MDA is also non-enzymatically generated from hydroperoxy fatty acids. MDA concentration was measured by the common photometrical thiobarbituric acid (TBA) method under reductive conditions<sup>1</sup>. Known unspecificity of TBA reaction was solved by using high performance liquid chromatography (HPLC) of the MDA-TBA adduct. Kikugawa et al.<sup>2</sup> demonstrated that in addition to malondialdehyde, alkadienals and alkenals produce MDA-TBA via an intermediate colourless compound. Ion-pairing liquid chromatography (IPLC) of MDA with post-column TBA reaction most likely excluded the interference of alkadienals and alkenals<sup>3</sup>.

In our approach we activated washed platelets by thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP). MDA was determined by two methods. First, acetonitrile deproteinized samples were diluted by ion-pairing buffer and analyzed by IPLC with post column derivatization with TBA (Ref.<sup>3</sup>). In the second method, the deproteinized samples were derivatized with 25 mM-TBA in 2 M sodium acetate buffer, pH 3. 25 µl of the sample was injected onto the column Merck Purospher RP-18e, 125×4 mm, 5 µm. Elution of MDA was performed isocratically with a mixture of methanol and 100 mM phosphoric acid pH 6.5 (40:60, v/v) at flow-rate of 0.5 ml.min<sup>-1</sup> at room temperature. The coloured compounds were monitored by UV detector at 532 nm. Thromboxane B<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) was used for analysis of TXB<sub>2</sub>.

Preliminary results confirmed correlation of MDA (de-



terminated by both chromatographic methods) and  $\text{TXA}_2$  amounts after stimulation of the platelets by thrombin and TRAP. We found a good agreement of literary results assessed by unspecific TBA method with our results obtained by HPLC methods. It could be most likely attributed to reductive conditions (stannous chloride treatment) used in direct TBA method for elimination of unspecific colored products. Similarly, both HPLC methods separate interfering substances from the MDA-TBA adduct.

*This work was supported by grants from IGA MZ (Prague, Czech Republic): 4809-3 and NK/4956-3.*

#### REFERENCES

1. Panse M., Block H., Förster W., Mest H.: Prostaglandins 30, 1031 (1985).
2. Kosugi H., Kato T., Kikugawa K.: Anal. Biochem. 165, 456 (1987).
3. Suttner J., Mášová L., Čermák J., Turek P., Gašová Z., Dyr J. E.: Chem. Papers 52, 451 (1998).

#### 22 VLIV N-NITRO-L-ARGININ METHYL ESTERU (L-NAME) NA CHEMILUMINISCENČNÍ AKTIVITU NEUTROFILŮ

LUCIE GALLOVÁ<sup>a</sup>, MILAN ČÍŽ<sup>b</sup> a ANTONÍN LOJEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra srovnávací fyziologie a obecné zoologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 602 00 Brno, <sup>b</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno

Fagocyty představují klíčový obranný mechanismus proti invadujícím mikrobiálním patogenům. Mezi vysoce toxické a nejučinnější zabíječské činitele fagocytů patří reaktivní metabolity kyslíku. Při jejich uvolňování vznikají elektronově excitované stavy, které při relaxaci emitují fotony. Tuto emisi lze monitorovat luminometricky. V poslední době jsou ověřovány možnosti využití chemiluminiscenční (CL) analýzy rovněž pro sledování tvorby reaktivních metabolitů dusíku<sup>1</sup>, vznikajících činností syntasy oxidu dusnatého (NOS). Cílem naší studie bylo popsat vliv N-nitro-L-arginin methyl esteru (L-NAME), inhibitoru NOS, na CL aktivitu neutrofilů v plné krvi.

K pokusům byla použita heparinizovaná krev ( $50 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) laboratorního potkana (podrobněji viz cit.<sup>2</sup>). Luminolem zesílená CL byla analyzována v bílých mikrotitračních destičkách na luminometru LM-01T (Immunotech, Praha). Reakční směs sestávala z  $1 \mu\text{l}$  plné krve, z  $1 \text{ mM}$  luminolu (Sigma) a HBSS, kterým byl celkový objem reakční směsi nastaven na  $250 \mu\text{l}$ . K indukci oxidativního vzplanutí neutrofilů bylo použito  $2,5 \mu\text{g}$  opsonizovaného zymosanu. Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech. Kinetika CL odpovědi každého vzorku byla sledována po dobu 60 minut. Bylo ověřeno, že stimulované neutrofilové vykazují vysokou CL aktivitu. Poté bylo přistoupeno k další serii experimentů, kdy do reakční směsi byl při startu měření navíc přidáván L-NAME. Bylo zjištěno, že tato látka významně snižovala CL aktivitu plné krve v závislosti na její koncentraci. V koncentracích vyšších než  $10 \text{ mM}$  L-NAME snížil CL aktivitu na úroveň pozadí. CL odpověď vzorků byla obnovena po přidání L-argininu (substrát NOS) v koncentracích odpovídajících koncentracím L-NAME.

V další serii experimentů bylo přistoupeno k testování antioxidačních vlastností L-NAME. Ty byly měřeny v chemickém systému porovnáním CL signálu naměřeného v přítomnosti L-NAME s kontrolním CL signálem získaným reakcí luminolu s několika typy reaktivních kyslíkových metabolitů, a to 1) superoxidovým radikálem generovaným systémem xantin-oxidasa ( $0,1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ )/hypoxantin ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 2) peroxidem vodíku ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 3) hydroxylovým radikálem generovaným reakcí peroxidu vodíku ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) se síranem železnatým ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a 4) peroxylovým radikálem tvořeným termální dekompozicí 2,2-azo-bis-2-amidinopropan hydrochloridu.

Zatímco L-NAME neměl v žádné ze sledovaných koncentrací vliv na CL aktivitu vyvolanou peroxylovým radikálem, CL indukovaná superoxidem, peroxidem vodíku a hydroxylovým radikálem byla inhibována v závislosti na koncentraci L-NAME. To dokazuje antioxidační vlastnosti L-NAME vůči těmto reaktivním formám kyslíku.

Závěry naší studie dokumentují, že pokles CL aktivity stimulovaných neutrofilů po aplikaci L-NAME zahrnuje nejenom inhibici NOS, ale i antioxidační vlastnosti L-NAME.

*Tato práce byla podpořena granty GA ČR 524/00/1223 a AV ČR S5004009.*

#### LITERATURA

1. Kudoh S., Suzuki K., Yamada M., Liu Q., Nakaji S., Sugawara K.: Luminescence 14, 335 (1999).
2. Lojek A., Číž M., Marnila P., Dušková M., Lilius E.-M.: J. Biolumin. Chemilumin. 12, 225 (1997).

#### 23 DETERMINATION OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN MATERNAL PLASMA DURING PHYSIOLOGICAL DELIVERY

DENISA MACEKOVÁ<sup>a</sup>, GUSTÁV KOVÁČ<sup>b</sup>, JAROSLAV HINŠT<sup>c</sup>, JANA PEREČKOVÁ<sup>b</sup>, MÁRIA REGENDOVÁ<sup>a</sup>, BRANISLAV ILLEK<sup>b</sup>, LUBOMÍR ŠPAČEK<sup>b</sup>, and BRANISLAV LÍŠKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Comenius University, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, <sup>b</sup>Biochemical Clinic, Dérer Hospital, <sup>c</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, SPAM, 831 03 Bratislava, Slovak Republic

Lipid peroxidation (LPX) is one of the processes which can play an important role in the development of pathological and functional changes of foetal, maternal and newborn tissues during pregnancy and delivery. The placenta, endothelial cells of the umbilical cord, maternal or foetal vessels are potential sources of LPX products<sup>1</sup>. The aim of study was to determine LPX products and biochemical parameters in maternal pre-delivery and post-delivery plasma, to estimate the relationship between amounts of LPX products and biochemical parameters indicating functional and pathological changes of organs.

Maternal venous blood samples were collected in the first and third period of physiological delivery. LPX products were detected as thiobarbituric acid reacting substances (TBARS)

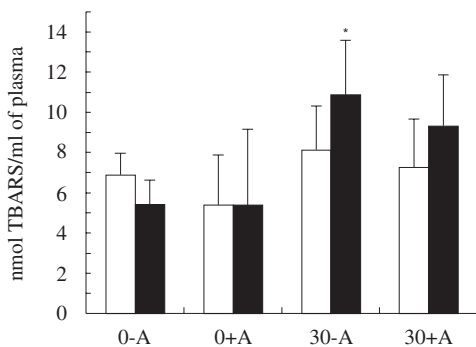


Fig. 1. TBARS amounts determined in maternal plasma during delivery; (0-A) plasma without any added effector, (0+A) plasma with LPX activator (125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  ascorbic acid and 5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$ ), (30-A) plasma after incubation (30 min., 37 °C), (30+A) plasma after incubation with LPX activator, difference (0-A) and (30-A) is marginally significant,  $n = 8$ ,  $\square$  pre-delivery and  $\blacksquare$  post-delivery plasma

Table I

Biochemical parameters determined in maternal plasma during delivery; proteins-total proteins, Fe – iron, TBC Fe – total iron binding capacity, Ca – calcium, P – inorganic phosphate, UA – uric acid, ALP – alkaline phosphatase, CK – creatine kinase, LD – lactate dehydrogenase, ( $n = 6-15$ )

	Pre-delivery average $\pm$ SEM	Post-delivery average $\pm$ SEM
Proteins [ $\text{g.l}^{-1}$ ]	65.49 $\pm$ 1.71	66.11 $\pm$ 1.52
Fe [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	11.03 $\pm$ 2.22	8.29 $\pm$ 1.43
TBC Fe [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	81.41 $\pm$ 4.47	86.71 $\pm$ 4.34
Ca [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]	2.5 $\pm$ 0.06	2.27 $\pm$ 0.07
P <sup>-</sup> [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]	1.29 $\pm$ 0.09	1.45 $\pm$ 0.14
UA [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]	187.00 $\pm$ 19.70	198.60 $\pm$ 20.80
ALP [ $\text{mkat.l}^{-1}$ ]	4.33 $\pm$ 0.5	4.26 $\pm$ 0.54
CK [ $\mu\text{kat.l}^{-1}$ ]	1.54 $\pm$ 0.28	2.67 $\pm$ 0.50
LD [ $\mu\text{kat.l}^{-1}$ ]	5.7 $\pm$ 0.26	5.81 $\pm$ 0.23

(Ref.<sup>2</sup>) in 4 experimental situations (Fig.1). Biochemical parameters were assayed in plasma by standard biochemical methods.

No significant differences were shown in TBARS levels between pre-delivery and post-delivery plasma in any experimental situation (Fig. 1). All biochemical parameters in pre-delivery and post-delivery maternal plasma were in the range of physiological values. Experimental data suggest that the intensity of LPX is probably not increased during physiological delivery. The increase of total iron binding capacity (TBC Fe) and ALP (tab. I) (increased production of ALP isoenzymes in the placenta) is physiological for pregnancy<sup>3</sup>. No effect of LPX activator on TBARS levels in maternal plasma and increased TBC Fe, suggest presence of some operative antioxidant systems decreasing the effect of LPX activator. Increased TBARS levels in post-delivery plasma after incubation without the LPX activator, suggest that in maternal plasma there are some changes which can activate LPX.

This work was supported by the Grant 1/6145/99 MŠ SR.

## REFERENCES

1. Rokyta Z., Racek J., Holeček V., Marik J. J.: *Cesk. Gynec.* 63, 340 (1990).
2. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: *Anal. Biochem.* 95, 351 (1979).
3. Dzúrik R.: *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*, str. 465. Osveta, Martin 1996.

## 24 LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN UMBILICAL CORD PLASMA AFTER PHYSIOLOGICAL DELIVERY

DENISA MACEKOVÁ<sup>a</sup>, GUSTÁV KOVÁČĎ<sup>b</sup>, JAROSLAV HINŠT<sup>c</sup>, JANA PEREČKOVÁ<sup>b</sup>, MÁRIA REGENDOVÁ<sup>a</sup>, BRANISLAV ILLEK<sup>b</sup>, LUBOMÍR ŠPAČEK<sup>b</sup>, and BRANISLAV LÍŠKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Comenius University, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovakia, <sup>b</sup>Biochemical Clinic, Dérer Hospital, <sup>c</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, SPAM, 831 01 Bratislava, Slovak Republic

It is possible that lipid peroxidation measurements may provide a sensitive indicator of intrapartum fetal stress<sup>1,2</sup>. There was found a positive association between levels of LPX products and acid-base balance (ABB) during delivery<sup>2</sup>. The aim of study was to determine LPX products, biochemical parameters in umbilical cord plasma after physiological delivery.

LPX products were detected as thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) (Ref.<sup>3</sup>) in 4 experimental situations (Fig. 2). Biochemical and acid-base balance (ABB) parameters were assayed in plasma and blood by standard biochemical methods.

All determined biochemical (Table I) and ABB parameters (Fig. 1) in umbilical cord plasma were in the range of physiological values after birth. None of the ten newborns showed any defect of adaptation after birth measured by Apgar scale. We suppose that TBARS amounts determined in umbilical

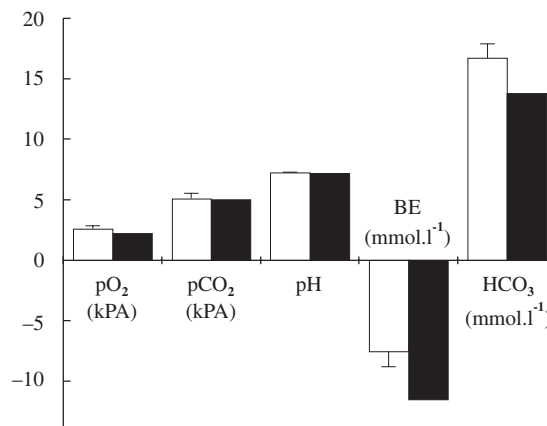


Fig. 1. ABB parameters determined in newborn blood,  $\square$  average,  $\blacksquare$  newborn

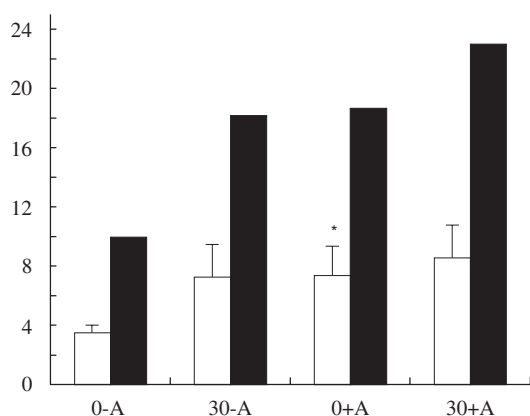


Fig. 2. TBARS amounts determined in umbilical cord plasma; (0-A) plasma without any added effector, (0+A) plasma with LPX activator ( $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$  ascorbic acid and  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$ ), (30-A) plasma after incubation (30 min,  $37^\circ\text{C}$ ), (30+A) plasma after incubation with LPX activator, difference (0-A) and (0+A) is marginally significant,  $n = 8$ , □ average, ■ newborn

cord plasma in this study could be physiological amounts of LPX products after physiological delivery. The increased TBARS production in umbilical cord plasma (Fig. 2) can be connected with imbalance in pro-oxidant and antioxidant equilibrium in favour of pro-oxidants. ABB parameters of one newborn were on the boundary of physiological values (Fig. 1) but TBARS levels of him were found to be three times higher in all experimental situations in comparison with average TBARS amounts of the total group studied (Fig. 2).

Table I

Biochemical parameters determined in umbilical cord plasma, proteins – total proteins, Fe – iron, TBC Fe – total iron binding capacity, Ca – calcium, P – inorganic phosphate, UA – uric acid, ALP – alkaline phosphatase, CK – creatine kinase, LD – lactate dehydrogenase, ( $n = 7-14$ )

Parameters	Average $\pm$ SEM
Proteins [ $\text{g.l}^{-1}$ ]	$52.23 \pm 2.03$
Fe [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$21.27 \pm 2.00$
TBC Fe [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$42.08 \pm 6.38$
Ca [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$2.44 \pm 0.1$
P <sup>-</sup> [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]	$1.80 \pm 0.29$
UA [ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ]	$151.5 \pm 20.8$
ALP [ $\mu\text{kat.l}^{-1}$ ]	$2.31 \pm 0.24$
CK [ $\mu\text{kat.l}^{-1}$ ]	$3.29 \pm 0.39$
LD [ $\mu\text{kat.l}^{-1}$ ]	$9.24 \pm 0.46$

This work was supported by the Grant 1/6145/99 MŠ SR.

## REFERENCES

- Zylinska L., Soszynski M.: *Programme and Abstracts 9th International Symposium*, Martin, 16.–9. August 1999, str. 82.

- Wang W., Pang C. C. P., Rogers M. S., Chang A. M. Z.: *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174, 62 (1996).
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: *Anal. Biochem.* 93, 351 (1979).

## 25 DOXORUBICIN INDUCED CARDIOTOXICITY AND NEPHROTOXICITY IN RATS

ŠÁRKA CHLOPČÍKOVÁ<sup>a</sup>, PETRA MIKETOVÁ<sup>a</sup>, JAROSLAV JEZDINSKÝ<sup>b</sup>, VÁCLAV LICHNOVSKÝ<sup>c</sup>, and JITKA PSOTOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, <sup>b</sup>Institute of Pharmacology, <sup>c</sup>Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

The effect of anthracycline cytostatics is related to DNA intercalation<sup>1</sup> and inhibition of topoisomerase II (Ref.<sup>2</sup>). The side effects of these drugs include cardiotoxicity and nephrotoxicity caused by oxidative stress<sup>3</sup>. The target of this study was to determine the dose of cytostatic which results in chronic cardiotoxicity and to choose optimal parameters for monitoring doxorubicin toxicity.

In this experiment doxorubicin (DOX, Adriablastina<sup>®</sup>) was intravenously administered to Wistar rats in a total cumulative dose of 4.0, 8.0, 12.0 and 16.0  $\text{mg.kg}^{-1}$  at weekly intervals for 8 weeks. Control animals received physiological saline. Rats were under anesthesia at the time of ECG measurement and blood and organs (heart, liver, kidneys, spleen and thymus) removal. The following plasma parameters were measured as indices of the doxorubicin induced toxicity: total antioxidative capacity, level of reduced glutathione (GSH), lipoperoxidative damage product concentration (TBARS), creatine, triacylglycerides, cholesterol, total protein, activity of alaninaminotransferase and cholinesterases. Organs were weighed. In kidney and liver homogenates the level of GSH and parameters of lipoperoxidative stress were assessed. Histological evaluation was carried out in kidneys and heart.

We found a heartbeat reduction at higher total cumulative DOX doses (dose  $12 \text{ mg.kg}^{-1}$  – 351 beats per min, dose  $16 \text{ mg.kg}^{-1}$  – 259 beats per min and control 400 beats per min) due to a prolonged QT interval. Changes of cardiac function were accompanied by macroscopic enlargement of kidneys, dilation of veins with subsequent venostasis. Liver and kidney weights were greater than control whereas the weight of thymus decreased. We found myocardial damage at a cumulative dose of  $12 \text{ mg.kg}^{-1}$  and kidney damage even at  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$ . This was accomplished by immunohistological staining of actin fibres. Using cyclic voltammetry we were unable to detect changes in total low molecular weight antioxidants. There was a fall in GSH levels and a rise of TBARS in plasma and liver homogenates. These changes were not detected in kidneys. There was a statistically significant increase in plasma cholesterol and triacylglycerols and decrease in total plasma proteins. This correlates with increasing cumulative doses of doxorubicin. Changes in other parameters were statistically insignificant.

A DOX dose of  $12 \text{ mg.kg}^{-1}$  provoked chronic cardiotoxicity; there was fall in heart rate and decline in contractile protein. Nephrotoxicity was induced by a dose of  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Hyper-

lipidemia contributed to the tissue damage as well as oxidative stress<sup>4,5</sup>. This model of doxorubicin induced chronic cardiotoxicity will be exploited in a study of protective effect of natural compounds.

*This work was supported by The Grant Agency (Project No. 303/97/P081) and The Ministry of Education, Youth and Sports of The Czech Republic (Project No. MSM:151100003).*

## REFERENCES

1. Sinha B. K., Chignell C. F.: *Chem.-Biol. Interact.* 28, 301 (1979).
2. Tewey K. M., Rowe T. C., Yang L., Halligan B. D., Liu L. F.: *Science* 226, 466 (1984).
3. Olson R. D., Boerth R. C., Gerber J. G., Nies A. S.: *Life Sci.* 29, 1393 (1981).
4. Iliskovic N., Hasinoff B. B., Maliszka K. L., Li T., Dane-lisen I., Singal P. K.: *Mol. Cell. Biochem.* 196, 43 (1999).
5. Matsui H., Morishima I., Numaguchi Y., Toki Y., Oku-mura K., Hayakawa T.: *Life Sci.* 65, 1265 (1999).

## 26 DISTURBANCES IN HEART AND SKELETAL MUSCLE COENZYME Q AND ALPHA-TOCOPHEROL LEVELS IN STREPTOZOTOCIN – DIABETIC RATS. EFFECT OF ANTIOXIDANT STOBADINE

JARMILA KUCHARSKÁ<sup>a</sup>, MILAN ŠTEFEK<sup>b</sup>,  
RUŽENA SOTNÍKOVÁ<sup>b</sup>, ZUZANA BRAUNOVÁ<sup>a</sup>,  
and ANNA GVOZDJÁKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pharmacobiochemical Laboratory, Faculty of Medicine, Co-menius University, Hlboká 7, 811 05 Bratislava, <sup>b</sup>Institute of Experimental Pharmacology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 16 Bratislava, Slovak Republic

Diabetes mellitus (DM) belongs to the chronic diseases associated with increased production of free oxygen radicals. Oxidative stress is involved in pathogenesis of various diabetic complications. Antioxidants are important to maintain the

balance between oxidant and antioxidant processes. Coenzyme Q (CoQ) and alpha-tocopherol (a-toc.) as the parts of the endogenous antioxidant system may play significant role in the development of diabetic complications. Aim of this study was to investigate the effect of eight – months experimental DM on the CoQ and a-toc. concentrations in heart and skeletal muscle of rats. Effect of dietary supplementation with the synthetic pyrroloindole antioxidant stobadine in various concentrations was studied.

Male Wistar rats 8–9 weeks old, weighing 200–230 g were used. DM was induced by a single i.v. dose of streptozotocin (STZ, 55 mg.kg<sup>-1</sup>). Ten days after STZ administration, animals with plasma glucose level >20 mmol.l<sup>-1</sup> were considered diabetic and were included in the study. The a-toc. and CoQ<sub>9</sub> levels in the heart and skeletal muscle tissue were determined by HPLC method after extraction<sup>1</sup>.

Myocardial a-toc. and CoQ<sub>9</sub> levels significantly increased after eight months of diabetes. Stobadine reversed the levels to control values in all used concentrations (Table I). In the skeletal muscle only CoQ<sub>9</sub> was increased in diabetic rats. Stobadine did not prevent this increase (Table II). Increased myocardial concentrations of a-toc. and CoQ in DM may be due to alterations in metabolism or storage of these lipophilic substances. Oxidative stress in diabetes can also induce biosynthesis of CoQ as defense mechanism of diseased heart and skeletal muscle. However in this study we have no information about mitochondrial concentrations of antioxidants. As we showed in our previous study<sup>1</sup> CoQ was found decreased in the rat heart mitochondria after 8 weeks of DM and can participate in mitochondrial dysfunction. In previous studies<sup>2,3</sup> antioxidant properties of stobadine were proved. Normalisation of a-toc. a CoQ<sub>9</sub> levels by chronic treatment of diabetic rats with antioxidant stobadine may be a manifestation of normalised oxidative status of the heart.

*This work was supported by VEGA grants 1/4112/97 and 2/6026/99.*

## REFERENCES

1. Kucharská J., Braunová Z., Uličná O., Zlatoš L., Gvozd-jáková: *Physiol. Res.*, in press.

Table I

Alpha-tocopherol and coenzyme Q<sub>9</sub> levels in control and diabetic rats. Effect of stobadine

	C	S	D	D + S <sub>1</sub>	D + S <sub>2</sub>	D + S <sub>3</sub>
Heart						
a-toc. [nmol.g <sup>-1</sup> w.w.]	80.9±10.6	74.5±10.5	193.3±32.5	68.7±10.3 <sup>b</sup>	83.4±10.2 <sup>b</sup>	88.8±19.5 <sup>c</sup>
CoQ <sub>9</sub> [nmol.g <sup>-1</sup> w.w.]	296.8±24.9	355.9±24.2	478.3±36.5 <sup>a</sup>	366.7±27.3 <sup>c</sup>	352.4±34.7 <sup>c</sup>	377.4±24.1 <sup>c</sup>
Muscle						
a-toc. [nmol.g <sup>-1</sup> w.w.]	24.6±2.84	17.8±3.35	22.9±2.46	18.2±1.92	21.2±3.40	20.1±2.62
CoQ <sub>9</sub> [nmol.g <sup>-1</sup> w.w.]	15.6±2.65	21.3±2.16	28.3±3.52 <sup>b</sup>	27.1±6.58	26.4±4.47	30.9±3.35

C-control rats (n = 6), S-control rats supplemented with 0.16 % stobadine (n = 7), D-32 weeks diabetic rats (n = 11), D+S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> – 32 weeks diabetic rats supplemented with stobadine 0.02, 0.05 and 0.16 % w/w (n = 6, 8, 6). Results are mean values ±SEM. Student's t-test C vs D, D vs D+S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, <sup>a</sup> p<0.005, <sup>b</sup> p<0.02, <sup>c</sup> p<0.05



2. Horáková L., Štolc S.: *Gen. Pharmac.* 30, 627 (1998).
3. Štefek M., Križanová L., Trnková Z.: *Life Sci* 65, 1995 (1999).

## 27 ÚČINOK KOENZÝMU Q<sub>10</sub> U PACIENTOV S NEFROPATIAMI

ANNA GVOZDJÁKOVÁ<sup>a</sup>, K. GAZDÍKOVÁ<sup>b</sup>,  
JARMILA KUCHARSKÁ<sup>a</sup>, VIERA SPUSTOVÁ<sup>b</sup>,  
ZUZANA BRAUNOVÁ<sup>a</sup> a ROMAN DZÚRIK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky LF UK, Bratislava, <sup>b</sup>Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Klinika imunológie a farmakoterapie, Bratislava, Slovenská republika

Oxidačný stres a znížená funkcia antioxidantných obranných systémov organizmu sa podieľajú na vzniku a vývoji nefropatií a ich komplikácií, hlavne s poškodením mitochondrií rôznych tkanív. K najčastejším komplikáciám patria kardiovaskulárne choroby, diabetes mellitus, dyslipidémia. Pomerne vzácne sú informácie o mitochondriálnych nefropatiách<sup>1</sup>. Ich sprievodným znakom je znížená hladina koenzýmu Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) – kľúčový zdroj energie v organizme so silnými antioxidantnými vlastnosťami<sup>2</sup>. Nedostatok CoQ<sub>10</sub> bol dokázaný aj u dialyzovaných pacientov<sup>3</sup>.

Cieľom štúdie bolo a) zistiť bazálne hladiny antioxidantov (CoQ<sub>10</sub>, alfa-tokoferol, beta-karotén), peroxidáciu lipidov (MDA) u pacientov s nefropatiami, b) v prípade nedostatku CoQ<sub>10</sub> porovnať efekt doplnkovej antioxidantnej terapie s vitamínom E, vitamínom C, riboflavínom oproti terapii s vitamínom E, vitamínom C, riboflavínom a CoQ<sub>10</sub> na funkciu obličiek, oxidačného stavu a antioxidantného systému u pacientov s nefropatiami. Do štúdie sme zaradili 15 pacientov s primárnymi nefropatiami (10 s chronickou tubulointersticiálnou nefritídou, 5 s renálnou tubulárnou acidózou), s priemerným vekom 61 rokov (19–82 rokov). Priemerná hodnota sérového kreatinínu zaradených pacientov bola 189,3±44,7 μmol.l<sup>-1</sup>, kreatinín klírensu 0,79±0,12 ml.s<sup>-1</sup>. Deväť pacientov boli liečení aj pre ochorenia kardiovaskulárneho systému a 3 užívali statíny. U všetkých pacientov sme vyšetrili funkcie obličiek, lipidové spektrum, peroxidáciu lipidov, antioxidantný stav (CoQ<sub>10</sub>, alfa-tokoferol, beta-karotén) v štyroch časových intervaloch: 1) pred začatím liečby; 2) 4-týždne po doplnkovej antioxidantnej liečbe s dennou dávkou 100 mg vitamínu E, 100 mg vitamínu C, 30 mg riboflavínu; 3) 8-týždňov ako v bode 2) + 240 mg CoQ<sub>10</sub>; 4) 12-týždňov ako v bode 3).

Po 12-týždňoch doplnkovej antioxidantnej terapie aj s CoQ<sub>10</sub> sme zaznamenali zníženie frakčnej exkrécie α-amino dusíka a zvýšenie vylučovania amoniaku močom. Parametre obličkových funkcií a lipidového spektra počas sledovania pacientov neboli štatisticky významne zmenené. Vstupné hodnoty CoQ<sub>10</sub> v krvi a v plazme u jednotlivých pacientov s nefropatiami boli v rozmedzí 0–25 % dolnej fyziologickej hladiny. Po 4-týždňovom účinku CoQ<sub>10</sub> sa hladiny v krvi aj v plazme zvýšili 14-násobne, po 8-týždňovom účinku CoQ<sub>10</sub> v krvi 16-násobne a v plazme 18-násobne. Vstupné hodnoty MDA sú štatisticky významne zvýšené u pacientov s nefropatiami oproti kontrol-

ným hodnotám, počas doplnkovej antioxidantnej terapie hodnoty MDA sa štatisticky významne nemenili.

Naše výsledky potvrdzujú údaje o nedostatku CoQ<sub>10</sub> a zvýšení peroxidácie lipidov u pacientov s nefropatiami. Výsledky o účinku CoQ<sub>10</sub> u pacientov s nefropatiami patria k prvým informáciám. Perorálna substitúcia CoQ<sub>10</sub> môže predstavovať doplnkovú antioxidantnú liečbu popri liečbe základných faktorov progresie nefropatie. Subjektívne pacienti znášali liečbu dobre, nežiaduce účinky sa nevyskytli počas liečby. Strohé informácie o mitochondriálnych nefropatiách, hladinách koenzýmu Q<sub>10</sub> a jeho terapeutickom účinku poskytuje perspektívu štúdií so zameraním nielen u pacientov s nefropatiami, u dialyzovaných pacientov, ale aj u pacientov po transplantácii obličiek. K týmto úvahám nás vedú výsledky predchádzajúcich našich štúdií u pacientov po transplantácii srdca<sup>4</sup>.

Výsledky sú parciálnym riešením grantu MŠ SR: 1/4112/97-99.

## LITERATÚRA

1. Dzúrik R., Gazdík K., Štefíková K., et al.: *Cas. Lek. Cesk.* 139, 38 (2000).
2. Buemi M., Allegra A., Rottig A., et al.: *Nephron* 76, 249 (1997).
3. Lippa S., Colacicco L., Calla C., et al.: *Molec. Aspects Med.* 197 (Suppl.), 213 (1991).
4. Gvozdjaková A., Kucharská J., Mizera S., et al.: *BioFactors* 9, 301 (1999).

## 28 OXIDATIVE STRESS, COENZYME Q<sub>10</sub> AND α-TOCOPHEROL IN HUMAN PLACENTA

ZUZANA BRAUNOVÁ<sup>a</sup>, JARMILA KUCHARSKÁ<sup>a</sup>, A. KAJGLOVÁ<sup>b</sup>, E. REICHRTOVÁ<sup>b</sup>,  
and ANNA GVOZDJÁKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pharmacobiochemical Laboratory of Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, <sup>b</sup>Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava, Slovak Republic

Human placenta is responsible for oxygen and energy supply to the fetus. The physiological function of placenta is dependent on mitochondrial respiratory chain and energy production<sup>1</sup>. Genetic and metabolic disturbances of mitochondria could be a cause of mitochondrial diseases<sup>2</sup>. Coenzyme Q<sub>10</sub> is a key part of the mitochondrial respiratory chain, occurs in all cellular and intracellular membranes. In previous works Reichrtová et al.<sup>3,4</sup> proved accumulation of heavy metals in human placenta in industry regions.

In our study we focused on the placenta CoQ<sub>10</sub> and α-tocopherol levels in placenta of two regions of Slovak Republic: Bratislava (BA – toxic chemical environmental exposure, number of placentas 43) and Stará Ľubovňa (SL – without chemical exposure region, number of placentas 40). Human placenta were divided into two groups: nonsmokers (BAN,

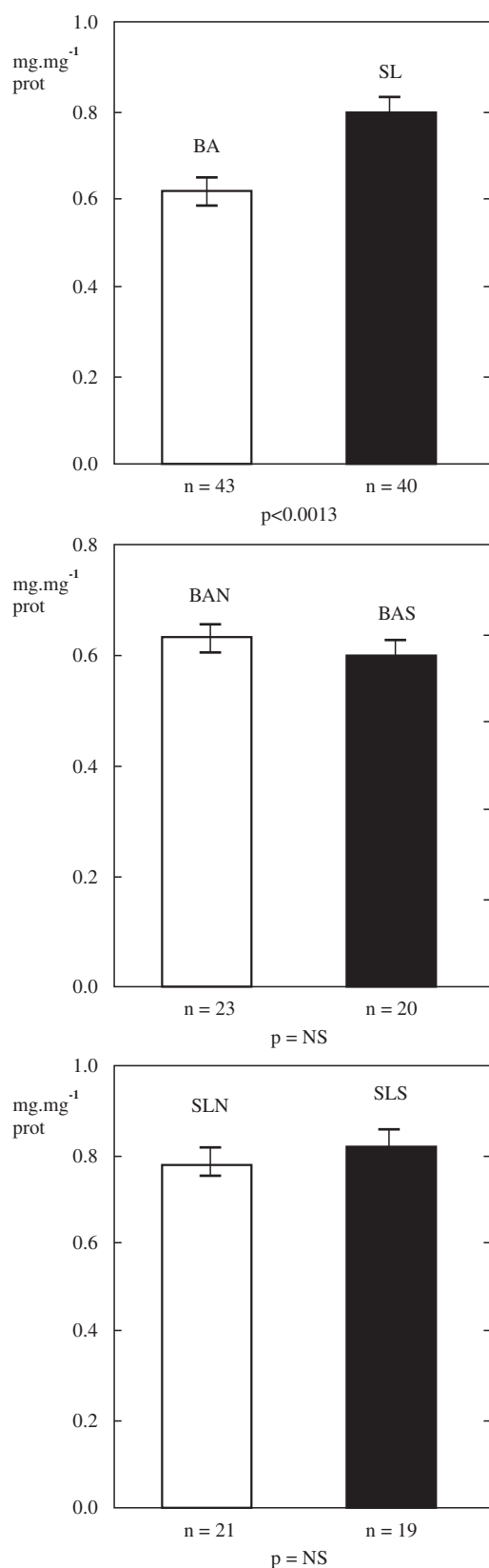


Fig. 1. Effect of chemical exposure and smoke on the CoQ<sub>10</sub> level in human placenta

SLN) and smokers (BAS, SLS). In this pilot study we proved significantly lower concentration of CoQ<sub>10</sub> in human plasma in BA region in comparison with SL region. The mean concentration of  $\alpha$ -tocopherol in human placenta did not differ significantly between BA and SL regions. However, in SL region we proved significantly decreased level of  $\alpha$ -tocopherol in placenta of smoking mothers. No differences were found in cytochrome oxidase activities (marker of mitochondria) between environmental regions. In our previous studies we proved early mitochondrial respiratory chain disturbances and decreased CoQ<sub>10</sub> levels in correlation with incipient rejection of transplanted human heart<sup>5,6</sup>.

We suppose, that oxidative stress, decreased level of CoQ<sub>10</sub> and dysfunction of mitochondria in human placenta can contribute to the genesis and rejection of fetus development during pregnancy as well as in allergy development in childhood. Exact knowledge of pathobiochemical mechanism participating in these diseases requires further studies.

## REFERENCES

1. Martinez et al.: *Endocrinology* 138, 2172 (1997).
2. Luft R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 1 (1995).
3. Reichrtová E., et al.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 361, 362 (1998).
4. Reichrtová E., et al.: *Human Environ. Toxicol.* 17, 176 (1998).
5. Kucharská J., et al.: *Physiol. Res.* 47, 399 (1998).
6. Gvozdjáková A., et al.: *BioFactors* 9, 301 (1999).

## 29 INFLUENCE OF SUPPLEMENTATION WITH FOLATE, ANTIOXIDANTS AND THEIR COMBINATION ON HOMOCYSTEINE LEVEL AND MARKERS OF OXIDATIVE STRESS

JAROSLAV RACEK, HANA RUSŇÁKOVÁ,  
LADISLAV TREFIL, and HANA PITTOVÁ

*Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University Hospital, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic*

Homocysteine (Hcy) belongs to risk factors of atherogenesis<sup>1-3</sup>; it is supposed that its effect is linked with increased production of free radicals (FR)<sup>4,5</sup>, the overproduction of which represents another risk factor<sup>6,7</sup>. Hcy level is known to be influenced by folate administration<sup>2,3</sup>, FR effect is controlled by antioxidants.

The aim of the study was: *i*) to confirm the decrease of Hcy level due to folate administration, *ii*) to evaluate whether Hcy decrease is followed by improvement of oxidative stress – decrease of lipid peroxidation and maintenance of antioxidant status, *iii*) to evaluate whether AO potentiate the effect of folate on Hcy levels and oxidative stress.

75 patients with lipid metabolism disorders (52 men and 23 women, average age of 57.3 years, variation 36–66 years) with increased level of Hcy (>15  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) were divided in

three sex- and age-matched groups. These patients were supplemented for two months with:

Group I – folate 5 mg daily;

Group II – antioxidants: vitamin E 300 mg,  $\beta$ -carotene 24 mg, vitamin C 200 mg, troloxerutine 600 mg and selenium 50  $\mu$ g daily;

Group III – combination of folate and antioxidants in above mentioned daily doses.

During study neither diet nor drug treatment were changed.

Concentrations of serum Hcy, folate in erythrocytes, parameters of lipid metabolism (total, HDL- and LDL-cholesterol, triglycerides, apolipoproteins (AI and B), plasma malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes, glutathione peroxidase (GSHPx) in whole blood and plasma antioxidant capacity (AOC) were measured before and after the supplementation; these data were controlled 3 months after end of supplementation. The values of above given laboratory tests before the study, at the end of a 2-month supplementation and 3 months after its interruption (i.e. month 2 vs 0, month 5 vs 2 and month 5 vs 0) were compared separately in each group. Friedman's paired test was used for statistical evaluation. Changes during given periods (i.e. month 2–0, further 5–2 and 5–0) were compared between groups I, II and III. We used and unpaired Wilcoxon's test for this purpose.

Folate caused a significant decrease of Hcy concentration ( $p < 0.001$ ). Antioxidants did not influence its level; when combined with folate, Hcy decrease was rather more pronounced and folate level remained increased even 3 months after end of its administration. MDA decreased during supplementation in all groups, but the decrease was significant only in group I ( $p < 0.05$ ). All supplementation types caused increase of GSH level ( $p < 0.001$ ) while AOC increased only in groups II and III ( $p < 0.05$ ). All parameters returned to their original value when the supplementation finished, only GSH remained slightly elevated. Lipid metabolism was not influenced in any of the groups.

Decrease of Hcy concentration is a well-known effect of folate administration<sup>2,3</sup>; our results confirmed this observation. Improved antioxidant status (namely increase of intracellular GSH and extracellular AOC) and decreased lipid peroxidation (decreased MDA concentration) also represent a typical effect of supplementation with antioxidants<sup>8</sup>. Nevertheless, some of our results support the idea of link between hyperhomocysteinemia and increased FR production. It is above all: more pronounced decrease of Hcy after co-administration of folate and antioxidants, the most significant decrease of MDA concentration due to folate supplementation and especially a significant rise of GSH concentration in all groups of patients. It can be supposed that folate causes decrease of FR production by improvement of hyperhomocysteinemia; this effect of folate was accompanied with saving of antioxidants and thus maintenance of their higher levels. As a consequence, diminished lipid peroxidation and reduced tendency to atherogenesis can be expected<sup>5</sup>.

While antioxidant mixture influenced only parameters of oxidative stress, folate administration led not only to Hcy decrease but also to GSH increase, perhaps due to lower FR production. Combination of folate with antioxidants caused a prolonged increase of folate level and probably also its positive effect. This treatment has no lipid-lowering effect.

## REFERENCES

1. Šimon J., Racek J., Rosolová H.: *Cas. Lek. Cesk.* 135, 263 (1996).
2. Ueland P. M., Refsum H., Stabler S. P., Malinow M. R., Anderson A., Allen R. H.: *Clin. Chem.* 39, 1764 (1993).
3. Bostom A. G., Lathrop L.: *Kidney Internat.* 52, 10 (1997).
4. Domagala O. B., Libura M., Szczeklik A.: *Thromb. Res.* 87, 411 (1997).
5. Blom H. J., Kleinvelde H. A., Boers G. H. J., Demacker P. A. M., Hak-Lemmers H. L. M., Te Poele-Pothoff M. T. W. B., et al.: *Eur. J. Clin. Invest.* 25, 149 (1995).
6. Berliner J. A., Heinecke J. W.: *Free Rad. Biol. Med.* 20, 707 (1997).
7. Ross R.: *N. Engl. J. Med.* 335, 488 (1996).
8. Racek J., Holeček V.: *Diagnóza* No 1, 3 (1997).

## 30 ÚLOHA REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU PŘI DEGRADACI MELANINŮ

JAN BOROVSANÝ<sup>a</sup> a MILAN ELLEDER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>2. ústav lékařské chemie a biochemie, <sup>b</sup>Ústav vrozených metabolických poruch, 1. lékařská fakulta UK, U nemocnice 5, 123 58 Praha 2

Biodegradace melanosomů a v nich obsažených melaninů zůstává záhadou. Existuje záplava histochemických prací popisujících biodegradaci melanosomů v sekundárních lysosomech se zdůrazňováním role lysosomálních hydrolas, avšak veškeré biochemické pokusy o degradaci melanosomů silnými hydrolytickými činidly *in vitro* selhaly (cit.<sup>1</sup>). S ohledem na strukturu melaninů a v souladu s možností bělení melaninů oxidačními činidly (cit.<sup>2</sup>) jeví se jako daleko pravděpodobnější mechanismus (bio)degradace melaninů cesta redoxní. Během studia lipopigmentů ve vzorcích kůže pozorovali jsme indukci autofluorescence epidermálního melaninu doprovázenou jeho postupným mizením.

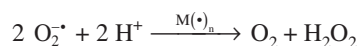
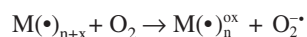
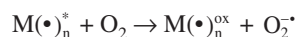
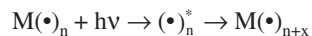
V úsilí o pochopení mechanismu tohoto jevu sledovali jsme podmínky indukce autofluorescence melaninů navozované 100 W UV lampou s excitačním filtrem 400–430 nm.

Autofluorescence eumelaninu byla studována v lidské epidermis, v pigmentových névech, v černých vlasech, v lidských choriodálních melanocytech a v retinálním pigmentovém epitelu, v izolovaných psích pilárních melanosomech<sup>3</sup> a v melanosomech připravených z prasečího melanomu<sup>4</sup> a s eumelaninem připraveným synteticky<sup>5</sup>. Fluorescence feomelaninu byla vyvolávána ve vzorcích zrzavých lidských vlasů a chlupů koček i v syntetickém feomelaninu<sup>6</sup>. Fluorescenci melaninu bylo možno vyvolat do 30 min; při přerušení fotoexcitace zůstala fluorescence stabilní řádově týdny, při pokračujícím ozařování vznikaly nefluoreskující degradační produkty a melanin se vybělil. Feomelaniny mající oproti eumelaninům o 2 řády vyšší obsah volných radikálů vykazovaly primární fluorescenci. Indukce fluorescence v synteticky připravených melaninech je důkazem, že nositelem aktivity jsou melaniny a nikoli pteridiny, jež mohou s nimi asociovat.

Studium podmínek indukce fluorescence ukázalo: 1) podmínkou indukce byla přítomnost vody; 2) použití světla kratší vlnové délky (340–380 nm) urychlilo rozvoj fluorescence;

3) přidání peroxidu vodíku enormně urychlilo vznik fluorescence a destrukci pigmentu; 4) odstranění peroxidu vodíku přidáním katalasy k ozařovaným vzorkům inhibovalo rozvoj fluorescence; 5) přidání azidu sodného, zhasiče volných radikálů<sup>7</sup>, tlumilo rozvoj fluorescence.

Pravděpodobným mechanismem indukce fluorescence melaninů je oxidační štěpení peroxidem vodíku za účasti volných radikálů:



Fluorescence melaninů po ozáření za normální teploty je originálním nálezem, neboť až dosud byla fluorescence melaninu zaznamenána jen po varu tkání s peroxidem vodíku<sup>8</sup>. Výsledky naznačují účast reaktivních forem kyslíku při fotodegradaci melaninů. Zůstává otázkou, zda volné radikály se mohou podílet na degradaci melaninu i za jiných podmínek.

*Tato práce byla podpořena grantem GA UK 47/99.*

#### LITERATURA

1. Borovanský J., Hach P., Smetana K. Jr., Elleder M., Matouš-Malbohan I.: *Folia Biol. (Praha)* 45, 47 (1999).
2. Elleder M.: *Vybrané kapitoly z patologie buňky II*, str. 81. Karolinum, Praha 1999.
3. Borovanský J., Hach P.: *Arch. Dermatol. Res.* 279, 54 (1986).
4. Seiji M., Shimao K., Birbeck M. S. C., Fitzpatrick T. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 100, 497 (1963).
5. Borovanský J., Melezínek I., Buděšinská A.: *Anal. Biochem.* 159, 246 (1986).
6. Deibel R. M. B., Chedekel M. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7306 (1982).
7. Slawinska D., Slawinski J.: *Pigment Cell Res.* 1, 171 (1987).
8. Rosenthal M. H., Kreider J. W., Shiman R.: *Anal. Biochem.* 56, 91 (1973).

#### 31 INHIBITION OF MITOCHONDRIAL ENZYMES BY TERT-BUTYLHYDROPEROXIDE (TBHP)

HANA RAUCHOVÁ<sup>a</sup>, HALKA LOTKOVÁ<sup>b</sup>, and ZDENĚK DRAHOTA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4,* <sup>b</sup>*Department of Physiology, Medical Faculty of Charles University, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic*

*Tert-butylhydroperoxide (TBHP) is used as a model substance for elucidation of mechanisms through which reactive oxygen species (ROS) participate in induction of necrotic and apoptotic processes and in degenerative process of ageing.*

There are known many effects of TBHP on cell metabolism<sup>1,2</sup>, however, it is not yet quite clear which toxic effects are due to direct interaction of TBHP with cell enzymes or other cell compounds and which effects are induced by TBHP metabolites or due to desintegration of cell membrane structures induced by lipoperoxidation process.

In our experiments we used isolated rat hepatocytes and isolated liver mitochondria<sup>3,4</sup> and we tested the inhibitory effect of 3 mM-TBHP on activity of various mitochondrial enzymes and on lipoperoxide formation. Respiration was measured by High resolution polarograph (Orobos, Austria) and level of lipoperoxides was detected as thiobarbituric acid-reactive substances<sup>5</sup>.

During incubation of isolated hepatocytes with 3 mM-TBHP after 10–15 min incubation formation of lipoperoxides can be detected. When respiration of hepatocytes was tested under similar experimental conditions we found in the presence of 3 mM-TBHP: *a*) increase of succinate oxidation in the absence of ADP (state 4 respiration), *b*) lower activity of ADP and FCCP stimulated respiration (state 3 respiration), *c*) lower inhibition of respiration by oligomycin (Table I). Nevertheless, when isolated mitochondria were incubated with 3 mM-TBHP in the presence of succinate we did not find any effect on ADP activated respiration. All NADH-dependent substrates tested (pyruvate and malate, glutamate and malate, palmitylcarnitine and malate) were, however, completely inhibited at 3 mM-TBHP as well as at 0.03 mmol.l<sup>-1</sup> concentration.

Table I

The effect of TBHP on respiration of isolated hepatocytes permeabilized by digitonin

	nmol oxygen/min/10 <sup>6</sup> cells		
	Control	+ tBHP	B/A
+SUCCINATE	13.4	22.8	1.7
+ADP	50.5	39.0	0.8
+OLIGO	10.3	19.1	1.9
+FCCP	66.3	35.5	0.5
+AA	0.9	1.8	–
+ADP/-ADP	3.8	1.7	0.4

Our data show that in hepatocytes the inhibitory effect of TBHP is more pronounced due to the inhibitory activity of its metabolites. Its action on isolated mitochondria is mainly due to direct effect of TBHP on mitochondrial enzymes.

*This work was supported in part by grants No. 303/98/0473 from the Grant Agency of the Czech Republic and 67/96 from Charles University.*

#### REFERENCES

1. Kennedy C. H., Church D. F., Winston G. W., Pryor W. A.: *Free Radical Biol. Med.* 12, 381 (1992).
2. Liu H., Kehrer J. P.: *Free Radical Biol. Med.* 20, 422 (1996).



3. Svátková R., Červinková Z., Kalous M., Rauchová H., Drahotka Z.: *Physiol. Res.* 46, 237 (1997).
4. Červinková Z., Svátková R., Kalous M., Rauchová H., Červinka M., Drahotka Z.: *Eur. Surg. Res.* 30, 371 (1998).
5. Rauchová H., Kalous M., Drahotka Z., Koudelová J., Mourek J.: *Physiol. Res.* 43, 323 (1993).

### 32 ŠTÚDIUM HLADÍN VITAMÍNU E A MALONDIALDEHYDU U DOJNÍC S HEPATÁLNOU INSUFICIENCIOU

PAVOL MUDROŇ a GABRIEL KOVÁČ

*Katedra vnútorných chorôb prežívavcov a ošipáných, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika*

U dojníc v puerpériu je syndróm stukovatenia pečene častým javom a býva sprevádzaný narušeným zdravotným stavom, zníženou fertilitou a produkciou<sup>1</sup>. Pomerne častou komplikáciou tohto syndrómu býva zlyhanie pečene, nezriedka končiace úhynom. Bolo však zistené, že samotná akumulácia tuku v pečeni nie je jedinou príčinou tohto stavu<sup>2</sup>. Keďže lipoperoxidatívne procesy sú v literatúre uvádzané ako jedny z najčastejších príčin ťažkého tkanivového poškodenia, rozhodli sme sa posúdiť ich intenzitu a zároveň zistiť aj stav vitamínu E u dojníc s klinicky manifestnou hepatálnou insuficienciou.

Do sledovania bolo zaradených 16 dojníc (7 s hepatálnou insuficienciou). Diagnostika hepatálnej insuficiencie sa opiera o klinické symptómy hepatálnej encefalopátie (klinický prejav pečenej zlyhania) a výsledky analýz aktivít enzý-

#### Tabuľka I

Plazmatický a hepatálny  $\alpha$ -tokoferol, triglyceridy a malondialdehyd (MDA) v pečeni (čerstvé tkanivo), krvné hladiny AST, GLDH, GGT, celkového bilirubínu, amoniaku, VMK, BHB a cholesterolu u dojníc s hepatálnou insuficienciou (n = 7) a u kontrolných zvierat (n = 9)

Parameter	Hepatálna insuficiencia	Kontrola
MDA [nmol.g <sup>-1</sup> ]	105,9±59,1 <sup>a</sup>	55,1±7,30
Triglyceridy [mg.g <sup>-1</sup> ]	120,7±43,2 <sup>a</sup>	58,3±41,6
Hepatálny $\alpha$ -tokoferol [mg.kg <sup>-1</sup> ]	2,39±1,56	3,62±1,00
Plazmatický $\alpha$ -tokoferol [mg.l <sup>-1</sup> ]	0,42±0,38 <sup>b</sup>	2,2±0,82
Amoniak [ $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> ]	65,2±27,0 <sup>b</sup>	20,6±8,8
AST [U.l <sup>-1</sup> ]	243±146 <sup>b</sup>	44,1±13,8
GLDH [U.l <sup>-1</sup> ]	141±123 <sup>a</sup>	17,4±22,5
GGT [U.l <sup>-1</sup> ]	120±101 <sup>a</sup>	20,8±20,5
Celkový bilirubín [ $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> ]	48,7±42,8 <sup>b</sup>	7,5±5,5
VMK [mmol.l <sup>-1</sup> ]	1,17±0,40 <sup>a</sup>	0,54±0,37
BHB [mmol.l <sup>-1</sup> ]	1,99±3,49	1,54±1,85
Glukóza [mmol.l <sup>-1</sup> ]	4,11±1,76	3,27±0,79
Albumín [g.l <sup>-1</sup> ]	26,2±3,4 <sup>a</sup>	31,6±3,70
Cholesterol [mmol.l <sup>-1</sup> ]	0,90±0,56 <sup>b</sup>	2,81±1,08

<sup>a</sup> p<0,05; <sup>b</sup> p<0,01

mov (AST > 80 U.l<sup>-1</sup> a GLDH > 15 U.l<sup>-1</sup>). Kontrolné zvieratá boli klinicky zdravé dojnice v puerpériu. V biotátoch pečene bol meraný malondialdehyd, triglyceridy a  $\alpha$ -tokoferol. V plazme boli stanovené:  $\alpha$ -tokoferol a amoniak; v sére: AST, GLDH, GGT, celkový bilirubín, voľné mastné kyseliny, kyselina  $\beta$ -hydroxymaslová (BHB), glukóza, albumín a cholesterol. Pre stanovenie amoniaku v arteriálnej krvi sa táto odoberala z a. axillaris<sup>3</sup>. Skupiny boli porovnané Wilcoxonovým t-testom.

Na základe získaných výsledkov (tab. I) možno konštatovať, že dojnice postihnuté klinicky manifestným zlyhaním pečene mali výrazný nedostatok vitamínu E, o čom svedčili najmä extrémne nízke hladiny v plazme ako aj jeho nízky obsah v pečeni. Ťažké narušenie pečenej funkcie bolo sprevádzané aj vysokou intenzitou lipoperoxidačných procesov v pečenej tkanive, ktoré sa prejavili vysokými hladinami malondialdehydu. Naše výsledky odкрývajú nové cesty k lepšiemu poznaniu patogenézy tohto ochorenia a poskytujú podklad pre odskúšanie nových terapeutických postupov.

#### LITERATÚRA

1. Reid I. M.: *Vet. Rec.* 107, 281 (1980).
2. Rehage J.: *Habilitationschrift*, Hannover 1996.
3. Nagy O., Šedovič M., Slanina L.: *Vet. Med. Czech* 39, 1 (1994).

### 33 POROVNÁNÍ OXIDAČNÍCH PRODUKTŮ VZNIKLYCH PŘI UV OZÁŘENÍ FAZOLU S PRODUKTY VZNIKLYMI PŘI STÁRNUTÍ

MARTINA SRBOVÁ<sup>a</sup>, NAĎA WILHELMOVÁ<sup>b</sup>  
a JIŘÍ WILHELM<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie, 2. LF UK, Plzeňská 221, 150 00 Praha 5, <sup>b</sup>Ústav experimentální botaniky AV ČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6

Teorie stárnutí založená na působení volných radikálů vysvětluje základní mechanismy stárnutí na molekulární úrovni. Charakteristickým produktem radikálových reakcí jsou lipofuscinoidní pigmenty (LFP), které se u živočichů akumuluji lineárně s přibývajícím věkem. LFP byly prokázány a analyzovány také u rostlin<sup>1,2</sup>, ale jejich úloha při stárnutí není zcela prozkoumána. Pro objasnění této úlohy jsme analyzovali vlastnosti a složení LFP vzniklých v děložních listech fazolu při senescenci (terminální fázi stárnutí) a po oxidačním stresu navozeném UV ozářením rostlin. K analýze LFP jsme využili jejich charakteristickou fluorescenci jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní vyhodnocení. Detailní popis fluorescenčních charakteristik jsme získali metodou trojrozměrných spektrálních souborů. Lipofilní extrakty byly dále rozděleny na jednotlivé frakce pomocí HPLC.

Doba života děložních listů činila u použitého kultivaru fazolu 16 dní. Pro UV ozáření byly vybrány mladé 8 denní rostliny. UV záření bylo vystaveno po 2 hodiny a vzorky byly odebrány po 4, 7, 24, 48 a 72 hodinách. Tyto vzorky byly porovnány s materiálem z neozářených rostlin starých 8, 11, 14 a 16 dní. Děložní listy byly po odběru zmrazeny a lyofilizovány. Pro analýzu LFP byly připraveny lipofilní

extrakty ve směsi chloroform-metanol (2:1, v/v). Chloroformová vrstva byla po extenzivním promytí vodou použita k dalším měřením. Ze souborů trojrozměrných spekter jsme získali hlavní excitační maximum (355 nm) a emisní maximum (415 nm), která jsme použili pro kvantitativní stanovení těchto fluoroforů. První signifikantní zvýšení hladiny fluoroforů bylo pozorováno až po 7 hodinách po UV ozáření (150 % kontrol) a jejich koncentrace dále rostla až dosáhla maxima 48 h po ozáření (desítnásobek kontrolní hodnoty). Výsledná hladina LFP po UV ozáření byla vyšší než u neozářených senescentních rostlin, u kterých činila 160 % kontrol. Přes velké kvantitativní rozdíly se tvar spekter jednotlivých vzorků navzájem nelišil, a to ani mezi ozářenými a neozářenými rostlinami. Tato měření podporují představu, že oxidační stres navozený UV ozářením dává vzniknout podobným produktům vznikajícím v průběhu stárnutí. Významná je skutečnost, že LFP nevznikly bezprostředně po UV ozáření z radikálů vzniklých ve vodné fázi, které mají krátkou dobu života. Kinetika produkce LFP v řádu dní naznačuje účast enzymových mechanismů. Dále jsme zkoumali složení LFP pomocí HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí. Podařilo se nám rozdělit směs fluoroforů na řadu frakcí. Zjistili jsme, že ve složení LFP po UV ozáření probíhají změny už od časných postiradiačních period. Byly nalezeny rozdíly ve složení vzorků po ozáření a v průběhu stárnutí.

Výsledky měření v této studii naznačují, že lipofilní oxidační produkty získané po UV ozáření a během stárnutí mají podobné charakteristiky a tudíž podporují představu o stárnutí jako procesu doprovázeném oxidačním stresem. Kvantitativní aspekty tohoto procesu vyžadují další studie.

#### LITERATURA

1. Wilhelm J., Wilhelmová N.: *Photosynthetica* 15, 55 (1981).
2. Wilhelm J., Wilhelmová N.: *J. Exp. Bot.* 49, 47 (1998).

### 34 EVALUATION OF ANTIRADICAL EFFECTS OF EXTRACTS AND MAIN FLAVONOIDS FROM THE ROOT OF *SCUTELLARIA BAICALENSIS*

HANA BOCHOŘÁKOVÁ, HANA PAULOVÁ,  
PAVEL MUSIL, and EVA TÁBORSKÁ

*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Masaryk University Brno, Komenského n. 2, 662 43 Brno, Czech Republic*

There are many reports relating to antioxidant activities of plant flavonoids in the last years. Interest has been focused especially on flavonoids contained in vegetables, fruits and beverages. Some of them e.g. quercetin, luteolin or catechins are more effective than known antioxidants such as ascorbic acid or tocopherol. Flavonoids are also present in many folk medicines.

We examined the flavonoids from the root of traditional Chinese herbal medicine *Scutellaria baicalensis* Georgi. (SB). It has been described a large number of interesting pharmacological effects of the extracts of this species including anti-inflammatory and antiallergic<sup>1,2</sup>. Even though the natural locali-

ties of the plant are eastern areas of Asia, it can be easily cultivated under European climate conditions.

The main components isolated from the root are flavonoids baicalein, wogonin, oroxylin and their glucuronides. Baicalein-glucuronide is known under the name baicalin. About 15 other minor flavonoids were isolated or detected in the root in addition to the above mentioned. The antioxidant properties of baicalin and baicalein have been described<sup>3</sup>, but there is no knowledge about the antioxidant properties of other flavonoids present in plant. Except of baicalein all other flavonoids from SB are not commercially available.

We isolated 5 main flavonoids (baicalin *I*, wogonin *II* and oroxylin *III*, wogonin-glucuronide *IV* and baicalein *V*) from the root of plant cultivated in the Centre for cultivation of medicinal plants in Brno, Czech Rep. with the aim to study and compare their antiradical properties. Their structures are in Fig. 1. At the same time the fractions obtained by the fractionation of the crude methanolic extract were tested to prove the possible presence of other components with antiradical activity. The radical scavenging ability was evaluated using the reaction with the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical<sup>4</sup>. Quercetin *VI*, the compound with well-known antiradical activity was also evaluated for comparison. IC<sub>50</sub> values were expressed as the concentration of a flavonoid (μmol.l<sup>-1</sup>) or fraction (μg.ml<sup>-1</sup>) which caused 50 % DPPH decoloration. The main components of the fractions were determined with using HPLC.

Among the *Scutellaria* flavonoids only baicalin and baicalein showed the significant scavenging effect with the value IC<sub>50</sub> 7.9 and 6.6 μM, respectively. The values of IC<sub>50</sub> were moderately higher comparing that for quercetin (3.1 μM). IC<sub>50</sub> for wogonin and wogonin glucuronide were > 200 μM indicating their very low scavenging activity, while oroxylin was inactive (IC<sub>50</sub> > 1000 μM). These results are in agreement with the assumption that for the antiradical activity of flavonoids the *ortho*-arrangement of hydroxyl groups on the aromatic ring is essential. The antiradical activity of the crude extract and fractions obtained by extraction with diethylether, ethylacetate

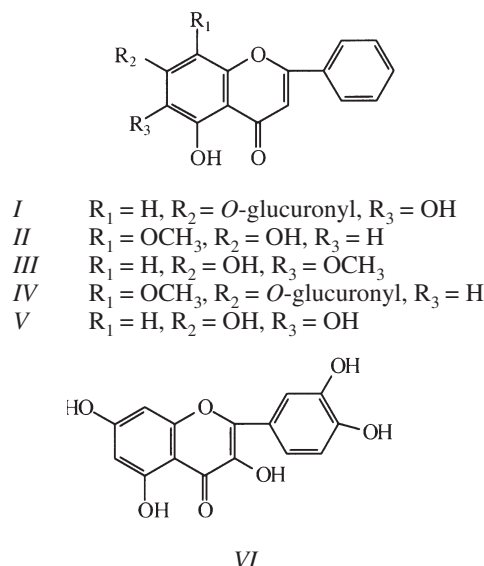


Fig. 1. The structural formulae of flavonoids used in this study

and butanol were comparable and correlated with the content of baicalin in these fractions.

These results indicate that mainly flavonoids baicalin and baicalein are responsible for antiradical activity of extracts from SB. Among the flavonoids of this plant only those two have an ortho-substitution on the aromatic ring. Baicalin was the main flavonoid of the root (8.12 % of the dried root) in the plant cultivated in the Czech republic while baicalein was a minor component. According to literature data<sup>5</sup> the ratio baicalein/baicalin in plants from natural localities varies in range 1:20–1:1 and their total content amounts 15–30 %. Then it can be concluded that the antiradical properties of preparations based on the root extracts from SB are due to high content of baicalin and baicalein comparable with the effect of purified compounds.

The investigation was supported by the grant FRVS 886/2000.

## REFERENCES

1. Kubo M., Masuda H., Tanaka M., Kimura I., Okuta H., Higashino M., Tani T., Namba K., Arichi S.: *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2724 (1984).
2. Koda A., Nagai H., Wada H.: *Nippon Yakurigaku* 66, 194 (1974).
3. Gao D., Tawa R., Masaki H., Okano Y., Sakurai H.: *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1383 (1998).
4. Slanina J., Paulová H., Táborská E.: *Pharmacol. Lett.* 7, 53 (1997).
5. Sagara K., Ito Y., Oshima T., Misaki T., Murayama H.: *J. Chromatogr.* 328, 289 (1985).

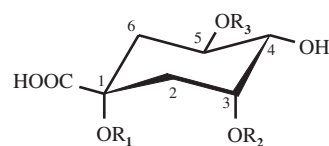
## 35 STRONG ANTIRADICAL ACTIVITY OF DICAFFEYLQUINIC ACIDS

HANA PAULOVÁ, JIŘÍ SLANINA,  
HANA BOCHOŘÁKOVÁ, and EVA TÁBORSKÁ

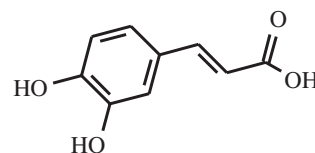
*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského n. 2, 662 43 Brno, Czech Republic*

Recent epidemiological data support a protective effect of vegetables, fruits, tea and wine intake against cancer or cardiovascular diseases. The protective effect can be also attributed to antioxidant polyphenolic compounds, such as flavonoids or phenolic acids, found in the plants in the high amounts. The flavonoids show a strong antioxidant activity *in vitro* and intake of flavonoids was inversely correlated to coronary heart disease mortality in 3 out of 5 epidemiological prospective cohort studies<sup>1</sup>. However, little is known about the antioxidative activity, bioavailability and health effect of dietary phenolic acids, such as hydroxycinnamates (e.g. caffeic and chlorogenic acid), components of many plant-derived foods<sup>2</sup>.

In this work, we determined an antiradical activity of dietary caffeoylquinic acids, 5-caffeoylquinic acid (5-CQA, trivial name chlorogenic acid, Fluka), 1,3-dicaffeoylquinic acid (1,3-DiCQA, trivial name cynarin), 1,5-dicaffeoylquinic acid (1,5-DiCQA) and caffeic acid (Sigma). The antiradical activity of caffeic acid derivatives was compared with that of L-ascorbic acid and flavonoids luteolin and luteolin-7-O-glu-



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
chlorogenic acid	H	H	caffeoyl
1,3-DiCQA	caffeoyl	caffeoyl	H
1,5-DiCQA	caffeoyl	H	caffeoyl



caffeic acid

coside that contain like caffeic acid the catechol group. Chlorogenic acid is only one commercially available caffeoylquinic acid, 1,3-DiCQA and 1,5-DiCQA were together with flavonoids luteolin and luteolin-7-O-glucoside isolated from the leaves of *Cynara cardunculus* (Asteraceae)<sup>3,4</sup>. The radical scavenging activity was measured using free stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

The antiradical effects of all phenolic acids and flavonoids were stronger than that of L-ascorbic acid ( $EC_{50} = 10.3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). The ability to scavenge the free stable DPPH radical increased with the number of the catechol groups in the order: caffeic acid ( $EC_{50} = 5.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) < chlorogenic acid ( $5.0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) < luteolin ( $4.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) < luteolin-7-glucoside ( $4.3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) < 1,3-DiCQA ( $3.9 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) < 1,5-DiCQA ( $2.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). The stronger antiradical activity of 1,5-DiCQA than that of 1,3-DiCQA may be rationalized by the presence of one equatorial caffeoyl group in 1,5-DiCQA, whereas 1,3-DiCQA has both axial caffeoyl groups. Comparing the scavenging activities, 1 mole of ascorbic acid reacted with approximately 2 moles of DPPH radical and 1 mole of 1,5-DiCQA scavenged about 6 moles of the radical. This is in good accordance to results obtained with 3,5-DiCQA (Ref.<sup>5</sup>). Our findings show that DiCQAs have the strong radical scavenging activity *in vitro*.

The interest in research of caffeoylquinic acids has increased greatly in the last years not only for their presence in the diet, but also for their significant biological activity, e.g. DiCQAs has been recently found as potent and selective inhibitors of HIV-1 integrase and HIV-1 replication<sup>6</sup>. However, very limited data are known about their bioavailability and metabolism in humans<sup>7</sup>.

## REFERENCES

1. Hollman P. C. H., Katan M. B.: *Free Rad. Res.* 31, S75 (1999).
2. Clifford M. N.: *J. Sci. Food Agric.* 79, 362 (1999).
3. Slanina J.: *Ph.D. dissertation*. Palacky University Olomouc, 1999.
4. Slanina J., Paulová H., Humpa O., Bochořáková H., Táborská E.: *Scripta Medica (Brno)* 72, 9 (1999).
5. Ohnishi M., Morishita H., Iwahashi H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M., Kido R.: *Phytochemistry* 36, 579 (1994).

6. McDougall B., King P. J., Wu B. W., Hostomsky Z., Reinecke M. G., Robinson W. E., Jr.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 140 (1998).
7. Williamson G., Day A. J., Plumb G. W., Couteau D.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 16 (2000).

**36 METAL-CATALYSED OXIDATIVE DAMAGE OF THE YEAST PLASMA MEMBRANE H<sup>+</sup>-ATPase: THE ROLE OF STRATEGIC CYSTEINE RESIDUES**

NADINA STADLER<sup>a</sup>, KAREL SIGLER<sup>b</sup>,  
and LIBUŠE VÁCHOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Botany, University of Bonn, Kirschallee 1, 53115 Bonn,* <sup>b</sup>*Institute of Microbiology, Academy of Sciences CR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4*

The first target of exogenous reactive oxygen species (ROS) in cells is the plasma membrane. We studied the ROS-induced inactivation of the main plasma membrane protein, the P-type PMA1 H<sup>+</sup>-ATPase. Although much more oxidation-resistant than animal P-type ATPases, the yeast H<sup>+</sup>-ATPase is also inactivated by Fenton reagent (Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) via metal-catalyzed oxidation at specific metal binding sites, most probably Cys residues. Three Cys residues (Cys221, Cys409 and Cys532) were found to play important roles in H<sup>+</sup>-ATPase sensitivity towards oxidants, and to interact with each other. The H<sup>+</sup>-ATPase is protected against oxidants by ATP binding, which was therefore used for defining the possible relationships between the strategic Cys residues. Another tool was the protection by the iron chelator deferoxamine and by the SH-group protecting dithiothreitol (DTT).

Cys221 situated far from the ATP-binding site plays a role in ATPase sensitivity to oxidants since its replacement with Ala increases the resistance of the enzyme against the Fenton reagent. It also leads to the loss of the protection of the enzyme by ATP and ADP, i.e. ATP binding no longer brings about the conformational change necessary for the protection. A loss of protection was found with also with DTT and deferoxamine. The lack of protection by DTT shows that Cys409 and Cys532 become freely oxidisable by <sup>•</sup>OH but inaccessible to the SH-protecting agent. Lack of protection by deferoxamine indicates that the two Cys residues are located in a "pocket" accessible to Fe<sup>2+</sup> but not to the larger chelator molecule. If Cys221 is replaced by Ala together with Cys409 or together with Cys532, the loss of protection due to replacing Cys221 alone is abolished.

Cys409 situated near the ATP-binding site aids in the resistance of the enzyme to oxidants, since its replacement with Ala increases the extent of oxidative H<sup>+</sup>-ATPase inactivation. However, when replaced together with Cys221, it abolishes the lack of protection behaviour found on replacement of Cys221 alone and the enzyme becomes amenable to protection by nucleotides, DTT and Desferal.

Cys532 is situated in the ATP-binding site. When replaced by Ala, the resulting mutant does not change its response to oxidant damage relative to the wild type. However, this replacement of Cys532 by Ala alters the ATP/ADP protection efficiency ratio from about 1 to some 1.6, i.e. Cys532 affects

the conformational change brought about by ATP binding. This change is abolished by simultaneous replacement of Cys221, but is not altered by simultaneous replacement of Cys409 so that the double mutant C409,532A shows an ATP/ADP protection ratio typical of C532A.

The data obtained with the double mutants indicate the existence of conspicuous regulatory actions and mutual interactions between the ATPase molecule segments where Cys221, 409 and 532 are located.

*The work was supported by CR Grant Agency (grant 204/99/0488), CR Ministry of Education (grant ME 315), NATO grant SA (CRG.CRGP 973150) and BMBF grant TSR-113-97.*

**37 PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANT ENZYMES AGAINST HEAVY METALS IN RUMEN BACTERIUM STREPTOCOCCUS BOVIS**

VIERA LENÁRTOVÁ<sup>a</sup>, KATARÍNA HOLOVSKÁ<sup>a</sup>,  
KATARÍNA HOLOVSKÁ<sup>b</sup>, and PETER JAVORSKÝ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, University of Veterinary Medicine, Komenského 71, 041 81 Košice,* <sup>b</sup>*Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Science, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovak Republic*

Heavy metals can be inhibitory to both the fermentative activity and growth of the rumen bacteria, thereby decreasing the productivity of animals. *Streptococcus bovis* is an important amylolytic, Gram positive bacterium present in relatively high amounts in the rumen contents as well as on the epithelial cells of the rumen wall of ruminants. A variety of bacteria, all facultative anaerobes, have developed efficient enzymatic and nonenzymatic mechanisms to eliminate the oxygen reactive species generated by heavy metals. In this study, we investigated changes brought about by mercury and copper in activity levels of antioxidant defence enzymes including superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione peroxidase (GSHPx, EC 1.11.1.9) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2).

*S. bovis* 4/1 used in this study was isolated from the rumen sheep and was grown in aerobic conditions in the medium containing 0, 5, 50 µg.ml<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup>, respectively. *S. bovis* was tolerant to 10 times higher concentration of Cu<sup>2+</sup> than Hg<sup>2+</sup>. SOD activity was determined according to method of Flohé and Ötting<sup>1</sup>. GSHPx was measured as described Flohé and Günzler<sup>2</sup> and GR according to Pinto et al.<sup>3</sup> Lipid peroxidation products as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined<sup>4</sup>.

The first line of defence against the generation of toxic oxygen species is the induction of SOD. SODs are metalloenzymes which can be cofactored by with either iron, manganese or copper and zinc<sup>5</sup>. Our previous experiments have indicated that SOD activity of *S. bovis* was Mn-SOD and this activity decreased when Fe<sup>2+</sup> was added to the growth medium. In the present study we also observed decreasing of activity evoked by Cu<sup>2+</sup> but increasing of this activity at the presence of Hg<sup>2+</sup> (Fig. 1). It is possible that iron and copper when added to the growth medium can compete with manganese in the active site



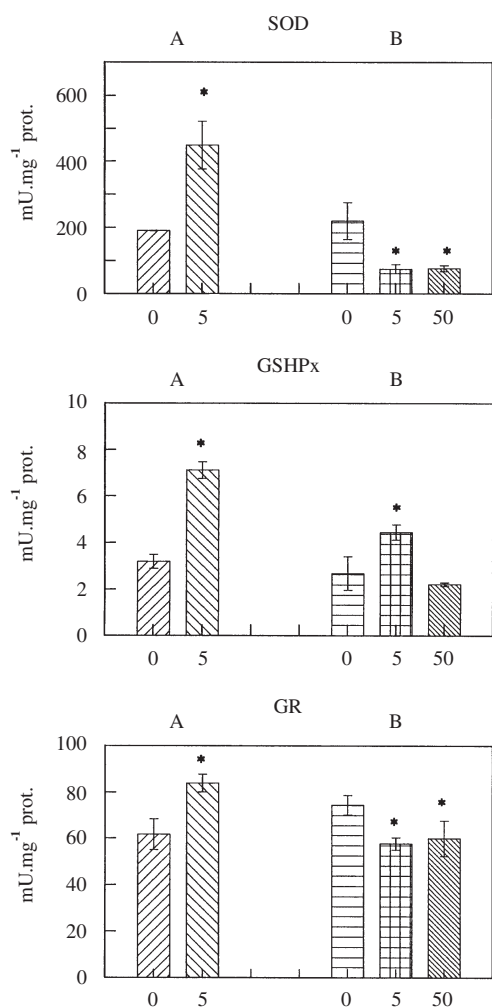


Fig. 1. Levels of SOD, GSHPx and GR enzymes activity in *S. bovis* 4/1. The results are expressed in mU.mg<sup>-1</sup> protein (\* p<0.05); asterisks represent significant differences between the control groups (0) and bacteria grown in the presence of Hg<sup>2+</sup> (A) or Cu<sup>2+</sup> (B), respectively

of enzyme and decrease its activity. On the other hand MnSOD is encoded by the *sodA* gene which is induced by environmental factors such as heavy metals through its metal respond element. There is also possibility that this element could be differently regulated by mercury and copper.

The GSHPx activity determined was only Se independent which acts mainly on organic hydroperoxides. Mercury evoked increasing of both GSHPx and GR activities. Cooperation of these enzymes was able sufficiently prevent the oxidative damage which is supported by unchanged values of TBARS. Copper increased GSHPx activity and GR activity was reduced at 5 µg.ml<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>, but TBARS values were still unchanged. 50 µg.ml<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> resulted in decreasing of GSHPx and GR activities and increasing of TBARS. This points that higher concentration of copper evoked the oxidative damage of bacteria.

This investigation was supported by Grant Agency VEGA 2/7026/20.

## REFERENCES

1. Flohé L., Ötting F.: *Methods Enzymol.* 105, 93 (1984).
2. Flohé L., Günzler W. A.: *Methods Enzymol.* 10, 114 (1984).
3. Pinto M. C., Mata A. M., López-Barea J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 1 (1984).
4. Gutteridge J. M. C.: *Biochem. J.* 224, 697 (1984).
5. Penninx M. J., Elskens M. T.: *Adv. Microbiol. Physiol.* 34, 269 (1993).

## 38 PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANT ENZYMES AGAINST HEAVY METALS IN RUMEN BACTERIUM *SELENOMONAS RUMINANTIIUM*

KATARÍNA HOLOVSKÁ<sup>a</sup>, VIERA LENÁRTOVÁ<sup>a</sup>, KATARÍNA HOLOVSKÁ<sup>b</sup>, and PETER JAVORSKÝ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, University of Veterinary Medicine, Komenského 71, 041 81 Košice, <sup>b</sup>Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Science, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovak Republic

The heavy metals evoke the forming of reactive oxygen species, which can cause DNA mutations, enzyme inactivation and membrane damage. The Fenton-like production of superoxide anion and hydroxyl radical appear to be involved for metals such as Fe, Cu, Cr, while Cd, Hg, Pb exerts oxidative stress via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation, GSH depletion and reactivity with membrane bound protein thiols<sup>1</sup>.

All bacteria, even strict anaerobes, appear to have mechanisms to detoxify these deleterious oxidants<sup>2</sup>. The primary antioxidant protection is provided by the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase. These enzymes have been extensively studied in aerobic bacteria, but much less is known about the enzymes in anaerobic organism. In our work we have studied the respond of the rumen strictly anaerobic bacterium *Selenomonas ruminantium* that represent up to 16 % of the total bacterial flora in the rumen, to environmental stress evoked by the mercury and copper.

*S. ruminantium* E-32 used in this study was isolated from the rumen of sheep. The influence of HgCl<sub>2</sub> and CuCl<sub>2</sub> was examined in the presence of 0, 5 and 50 µg.ml<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup>, respectively. Superoxide dismutase activity (SOD, EC 1.15.1.1) was determined by the method of Flohé and Ötting<sup>3</sup>, catalase (CAT, EC 1.1.1.6) by the method of Sizer and Beers<sup>4</sup>, glutathione peroxidase (GSHPx, EC 1.11.1.9) was measured according to Flohé and Günzler<sup>5</sup> and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) according to Pinto et al.<sup>6</sup> Lipid peroxidation products measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined according to Gutteridge<sup>7</sup>.

Recent evidence from several laboratories has indicated that SOD and CAT are present in various anaerobes, grown without oxygen exposure<sup>8</sup>. Our results showed no activity of these enzymes and they were not induced in the presence of Hg<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup> respectively. *S. ruminantium* exhibited only the selenium independent form of GSHPx, which acts mainly on organic hydroperoxides and NADPH specific GR activity

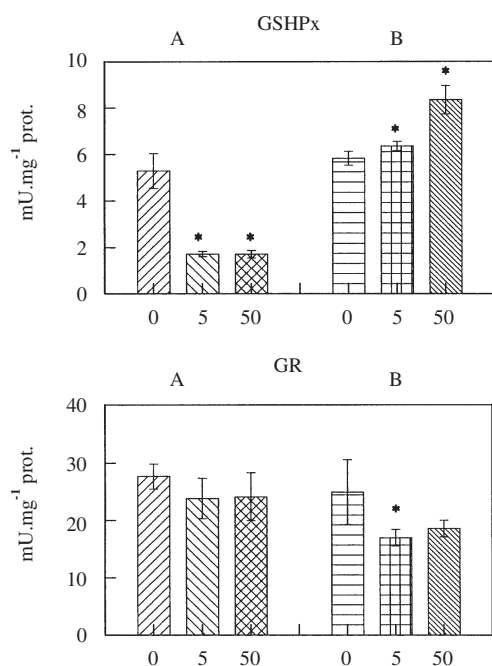


Fig. 1. Levels of GSHPx and GR enzymes activity in *S. ruminantium* E-32. The results are expressed in mU.mg<sup>-1</sup> protein (\* p<0.05); asterisks represent significant differences between the control groups (0) and bacteria grown in the presence of Hg<sup>2+</sup> (A) or Cu<sup>2+</sup> (B), respectively

(Fig. 1). In the presence of Hg<sup>2+</sup>, the GSHPx was decreased 3.00 fold and GR activity was the same as in control group. It is interesting that in despite the inhibition of GSHPx activity, an increase in TBARS content was observed only in the presence of 50 µg.ml<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup>. This low sensitivity to Hg<sup>2+</sup> is probably a result of sulfide production, which was evident from the black precipitates formed during the growth of this bacterium. Enzyme activities were influenced by the different way with copper. The GSHPx activity was increased (1.7 fold), GR activity was decreased (1.40 fold) and TBARS content was significantly increased in the presence of 5 and 50 µg.ml<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>. As our results show, the antioxidant defense mechanisms in *S. ruminantium* differently respond to environmental stress evoked by Hg<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup>.

This investigation was supported by Grant Agency VEGA 2/7026/20.

#### REFERENCES

1. Stohs S. J., Bagchi D.: Free Radical Biol. Med. 18, 321 (1995).
2. Rosner J. L., Storz G.: Curr. Top. Cellular Regulation 35, 163 (1997).
3. Flohé L., Ötting F.: Methods Enzymol. 105, 93 (1984).
4. Sizer I. W., Beers R. F.: J. Biol. Chem. 195, 133 (1952).
5. Flohé L., Günzler W. A.: Methods Enzymol. 105, 114 (1984).
6. Pinto M. C., Mata A. M., López-Barea J.: Arch. Biochem. Biophys. 228, 1 (1984).
7. Gutteridge J. M. C.: Biochem. J. 224, 697 (1984).
8. Rocha E. R., Smith C. J.: J. Bacteriol. 177, 3111 (1995).

#### 39 EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON THE MOLECULAR STRUCTURE AND PROTEOLYTIC SUSCEPTIBILITY OF *S. CEREVISIAE* MEMBRANE H<sup>+</sup>-ATPase *IN VITRO*

HELENA KUČEROVÁ, LIBUŠE VÁCHOVÁ, and KAREL SIGLER

Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology AS CR, Videňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Proteins are an important target of reactive oxygen species (ROS) in living cells. Damage brought about by ROS was studied on the H<sup>+</sup>-ATPase, the key yeast plasma membrane enzyme. OH<sup>•</sup> radicals were generated by the Fenton reaction Fe<sup>2+</sup>(Cu<sup>2+</sup>)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This treatment inactivated the enzyme in isolated plasma membranes of *S. cerevisiae*<sup>1</sup>. The total content of SH-groups in membrane proteins (measured by using DTNB (Ref.<sup>2</sup>)) dropped by only 10 % after the treatment with Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The extent of SH-group oxidation of the ATPase alone could not be determined by this method. 1-D SDS PAGE and immunoblotting showed that, if it occurs, the oxidation of SH-groups gives rise to intramolecular S-S bonds in ATPase molecules. Intermolecular S-S bonds leading to aggregation were rare. A small portion of membrane proteins created aggregates, more expressed when DTT was omitted during sample preparation for PAGE, indicating that some of them can be caused by S-S bonding. These aggregates of high M<sub>r</sub> were hard to examine by immunoblotting since their properties prevent their transfer to the PVDF membrane. A conspicuous aggregation (the fraction remaining in the well) occurred only after OH<sup>•</sup>-treatment of membrane proteins denatured by TCA. No significant fragments of H<sup>+</sup>-ATPase were observed after the Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

The proteinase subtilisin added exogenously to isolated nontreated membranes slightly shortened some ATPase molecules (M<sub>r</sub> 105 kDa) and created two additional bands, probably by hydrolyzing their N- and/or C-terminal part. After the Fenton treatment, the concentration of all these three molecular forms of ATPase dropped and several new bands of lower M<sub>r</sub> were found; this effect was more marked with Cu Fenton. A similar effect was caused also by Cu alone, but the hydrolysis by subtilisin was lower than in ATPase exposed to Cu Fenton. This effect was suppressed to some extent by the addition of DTT, or when the reaction with Cu was carried out in anaerobic conditions. Hence even the ATPase embedded in the membrane after oxidation by ROS is more sensitive to proteolytic attack.

Plasma membrane isolation was done according to Ref.<sup>3</sup> 1-D SDS PAGE: Membrane proteins were denatured in the presence of SDS and DTT 10 min at 30 °C. 9 % acrylamide gel was used for separation of proteins. These were blotted to the PVDF membrane and ATPase was visualised using specific polyclonal antibodies against H<sup>+</sup>-ATPase. Secondary antibodies labelled with peroxidase followed by DAB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NiCl<sub>2</sub> were used for visualization of H<sup>+</sup>-ATPase and its fragments. The treatment with ROS and subtilisin was accomplished on ATPase molecules *in situ* in isolated plasma membranes. Before subtilisin treatment and denaturation for SDS

PAGE, Cu was eliminated by its chelating with EDTA while  $H_2O_2$  was removed by catalase.

This work was supported by CR Grant Agency (204/00/0488) and Czech Ministry of Education (ME 315).

## REFERENCES

1. Stadler N., Höfer M., Sigler K.: Free Radical Biol. Med., submitted
2. Ellman G.L.: Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).
3. Dufour J.-P., Amory A., Goffeau A.: Methods Enzymol. 157, 513 (1988).

#### 40 EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON SPORULATING CULTURES OF *BACILLUS MEGATERIUM*

LIBUŠE VÁCHOVÁ and HELENA KUČEROVÁ

Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology AS CR, Videňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Sporulating *B. megaterium* was used to study the effectiveness of its defence system against reactive oxygen species (ROS) not only in connection with growth arrest but also with cytodifferentiation. We followed the effect of  $H_2O_2$  (0–5 mM)

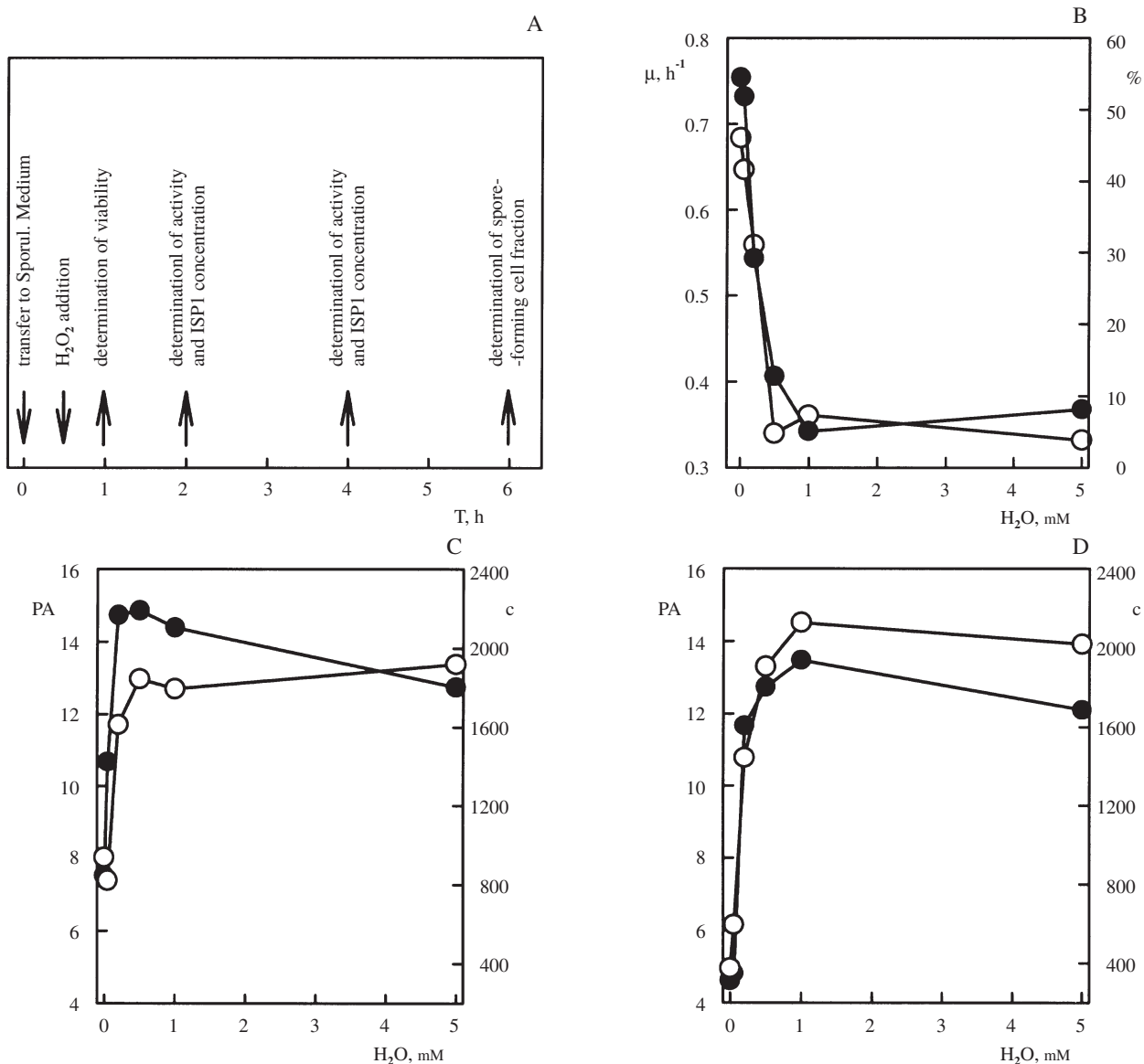


Fig. 1. Effect of  $H_2O_2$  on sporulating *B. megaterium*; experimental timetable (A). Growing culture before the end of the exponential phase was transferred to a sporulation medium (SM).  $H_2O_2$  was added at  $T_{0.5}$ ; the viability was determined as population growth rate  $\mu$  after 5-fold dilution of culture portions with growth medium at  $T_1$ ; at  $T_2$  and  $T_4$ , the proteolytic activity (PA) against  $^{14}C$  denatured proteins was assayed<sup>3</sup> and the concentration of intracellular proteinase ISP1 (as absorbance) was determined by image analysis of immunoblots. The sporulation efficiency (%) was determined at  $T_6$  by counting the proportion of spore-containing cells. Effect of  $H_2O_2$  on viability  $\mu$  (open-) and per cent sporulation (closed circles) (B); on proteolytic activity PA (closed-) and ISP1 concentration c (open circles) at  $T_2$  (C) and at  $T_4$  (D)

on cell viability, sporulation effectiveness as well as the activity and concentration of intracellular serine protease ISP1 during incubation in sporulation medium (SM). The arrangement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment is schematically presented in Fig. 1A. At 0.5 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lowers cell viability as well as sporulation efficiency similarly as does 5 mM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1B). Both processes were, however, only slightly impaired when the OD<sub>650</sub> of the culture transferred to SM was >1.0 (end of the exponential growth phase). This is probably due to the induction of catalase by starvation<sup>1</sup>. Among the targets of ROS in cells are cellular proteins. Hence proteinases belong usually to general stress proteins<sup>2</sup>. Their role is to hydrolyze harmful protein molecules damaged by stress. In contrast to *B. subtilis*, ISP1 – the major intracellular proteinase in bacilli – behaves in sporulating *B. megaterium* as a heat stress protein<sup>3</sup>. The rise in proteolytic activity during sporulation in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is paralleled by increased ISP1 concentration (Fig. 1C, D). This indicates that ISP1 belongs to general stress proteins in *B. megaterium*.

*This work was supported by CR Grant Agency (204/00/0488) and Czech Ministry of Education (ME 315).*

## REFERENCES

- Engelmann S., Hecker M.: FEMS Microbiol. Lett. 145, 63 (1996).
- Gerth U., Kruger E., Derre I., Msadek T., Hecker M.: Mol. Microbiol. 28, 787 (1998).
- Kučerová H., Chaloupka J.: Curr. Microbiol. 31, 39 (1995).

## 41 THE REGIONAL DISTRIBUTION OF CYCLIC GMP IN THE RABBIT'S SPINAL CORD UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

JAROSLAV PAVEL, NADEŽDA LUKÁČOVÁ,  
and JOZEF MARŠALA

*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovak Republic*

The physiological significance of comparing the topographical distribution of NADPHd-exhibiting and/or NOS-immunoreactive and NO-synthesizing neurons and cGMP-immunoreactive neurons was strongly enhanced by the finding that the activation of the soluble guanylate cyclase, acting as a cytoplasmic receptor for NO, can stimulate the production of cGMP.

In search for a causal explanation of the spinal afferent processing, the regional distribution of cGMP in different spinal cord gray and white matter compartments, thought to be the final branch of NOergic-cGMP pathway, appeared to be significant<sup>1</sup>. Therefore, the present study was carried out using radioimmunoassay detection for cGMP in the gray and white matter compartments of lumbosacral segments in the spinal cord of rabbit.

The results indicated considerable regional differences in the levels of cGMP in the lumbosacral spinal cord regions under physiological neuronal activity. Comparing the levels

of cyclic GMP in the gray matter compartments, the highest level was detected in the dorsal horns and the lowest in the ventral horns (Table I). This finding supports the view expressed in several studies that the presence of cGMP in the dorsal horn neurons and, perhaps glia, is required for nociceptive signalling at specific loci in the dorsal horn and is a basic prerequisite for normal functioning of the nitric oxide-cGMP pathway<sup>2,3</sup>. An intriguing findings is that a close correlation can be seen between a high level of cGMP in the dorsal horn and a high level of catalytic NOS activity in the laminae I–VI of the dorsal horns assessed in the lower lumbosacral segments<sup>4</sup>. Thus, this new quantitative data support the existence of the NOS (NO)-cGMP transduction system in the gray matter of the dorsal horns.

Table I

Distribution of cGMP in the lumbosacral spinal cord regions. Data are means of 4 experiments ±SEM. The results are expressed as nmol cGMP/mg wet. wt. and statistically evaluated by ANOVA test as well as by the Tukey-Kramer test; <sup>a</sup> p<0.001 compared with dorsal horns, <sup>b</sup> p<0.01, <sup>c</sup> p<0.001 compared with dorsal columns

	nmol of cGMP/mg wet. wt.
Dorsal horns	0.185±0.003
Intermediate zone	0.104±0.002 <sup>a</sup>
Ventral horns	0.078±0.002 <sup>a</sup>
Dorsal columns	0.053±0.002
Lateral columns	0.073±0.003 <sup>c</sup>
Ventral columns	0.041±0.003 <sup>b</sup>

Levels of cyclic GMP in control white matter regions were found in descending order: lateral columns > dorsal columns > ventral columns (Table I). The non-synaptic nature of the white matter excludes the possibility of a direct glutamate-induced neuronal membrane-bound NMDA receptor stimulation. Therefore, the perinodal astrocytes in the white matter may be a specific non-neuronal element possessing both NOS and an isoform of guanylyl cyclase that can be activated with NO (Ref.<sup>5</sup>). This explanation is supported by the finding that cultured astrocytes can express a constitutive nitric oxide synthase<sup>6</sup>.

*This research was supported by the VEGA Grant No. 2/7222/20 from the SAS.*

## REFERENCES

- Maršala J., Maršala M., Vanický I., Taira Y. J.: Comp. Neurol. 406, 263 (1999).
- Morris R., Southam E., Gittins S. R., de Vente J., Garthwaite J.: Eur. J. Neurosci. 6, 876 (1994).
- Salter M., Strijbos P. J., Neale S., Duffy C., Follenfant R. L., Garthwaite J.: Neuroscience 73, 649 (1996).
- Lukáčová N., Čížková D., Maršala M., Jalč P., Maršala J.: Neuroscience 94, 229 (1999).
- Murad F.: Recent Prog. Horm. Res. 49, 239 (1994).
- Ma L., Morita I., Murota S.: Neurosci. Lett. 174, 123 (1994).



## 42 REGIONAL DISTRIBUTION OF CATALYTIC NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY IN THE RABBIT'S SPINAL CORD AFTER PERIPHERAL AXOTOMY

NADEŽDA LUKÁČOVÁ and PAVOL JALČ

*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovak Republic*

Nitric oxide (NO), simple but highly reactive molecule, has been implicated as a neurotransmitter or modulator in the central and peripheral nervous system, and, a mediator of neurotoxicity in neurodegenerative disorders<sup>1,2</sup>. It has been suggested by numerous studies that calcium influx via NMDA receptors is the principal inducer of free radical production<sup>3,4</sup>, including nitric oxide synthase (NOS) enzymatic activity. Sciatic nerve transection may upregulate activity of NOS in cell bodies located in spinal ganglion and to evoke major reorganization of dorsal horn function<sup>5,6</sup>. Therefore, we investigated the effect of transection of sciatic nerve on NOS activity, measured by radioactive detection, in the spinal cord divided into three gray matter regions.

Table I  
Percentage distribution of catalytic nitric oxide synthase (cNOS) activity in the L<sub>5</sub>–L<sub>6</sub> segments of the rabbit's spinal cord after unilateral sciatic nerve transection

Spinal cord regions	cNOS activity [% of control]
Dorsal horns	125.454 <sup>a</sup>
Intermediate zone	103.698
Ventral horns	112.554
Undivided spinal cord	115.011

Data are means of five experiments (n = 5); <sup>a</sup> p<0.05 with respect to nonligated spinal cord regions

The peripheral axotomy was induced by the right sciatic nerve transection in five male rabbits. Two weeks following injury, experimental animals were anesthetized, spinal cord was frozen, cut in cryostat at –12 °C and divided into dorsal horns, intermediate zone, ventral horns and undivided spinal cord, respectively. Catalytic NOS activity was determined by the conversion of [<sup>3</sup>H]-arginine to [<sup>3</sup>H]-citrulline<sup>7</sup> and expressed as dpm.μg<sup>-1</sup> protein.

It was shown that after unilateral transection of sciatic

nerve, there was significant increase in enzyme activity in the dorsal horns on the ipsilateral side of the spinal cord in comparison to the contralateral side, while that found in the intermediate zone and ventral horns remained non significantly changed. There was no statistical difference in cNOS activity on control and injured side, when spinal cord was examined as a whole (Table I). The results of earlier studies have shown that whereas synthesis of NOS in lower lumbar neurons of dorsal root ganglion is strongly upregulated in response to peripheral nerve injury<sup>8</sup>, peripheral axotomy induced a decrease in NOS-LI in the dorsal horn, a region rich in NADPHd-exhibiting and/or NOS-IR neurons<sup>9-11</sup>. Our results suggest that an increase (125 %) of citrulline production in dorsal horns may reflect a higher density of NOS-immunoreactive fibers seen in the dorsal horns as a response to peripheral nerve lesion<sup>12</sup>.

*This work was supported by the VEGA grant No. 2/7222/20.*

### REFERENCES

1. Garthwaite J., Southam E., Boulton C. L., Nielson E. B., Schmidt K., Mayer B.: *Molec. Pharmac.* 48, 184 (1995).
2. Dawson V. L., Dawson T. M., London E. D., Brecht D. S., Snyder S. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6368 (1991).
3. Liška B., Brechtlová M., Barošková Ž., Podhradský J., Kozinková M., Kuračka L., in: *Biologické podklady psychických porúch* (Sikora J., Fišar Z., Petrovický P., Jiráček R., ed.), p. 142. Galén, Praha 1997.
4. Barošková Ž., Liška B., Brechtlová M., in: *Biologické podklady psychických porúch* (Sikora J., Fišar Z., Petrovický P., Jiráček R., ed.), p. 19. Galén, Praha 1997.
5. Verge V. M., Xu Z., Xu X. J., Wiesenfeld H. Z., Hokfelt T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11617 (1992).
6. Fiallos-Estrada C. E., Kummer W., Mayer B., Bravo R., Zimmermann M., Herdegen, T.: *Neurosci. Lett.* 150, 169 (1993).
7. Brecht D. S., Snyder S. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 682 (1990).
8. Luo Z. D., Chaplan S. R., Scott B. P., Cizkova D., Calcutt N. A., Yaksh T. L.: *J. Neurosci.* 19, 9201 (1999).
9. Maršala J., Kluchová, D., Maršala M.: *Expl. Neurol.* 145, 165 (1997).
10. Maršala J., Vanický I., Maršala M., Jalč P., Orendáčová J., Taira Y.: *Neuroscience* 85, 847 (1998).
11. Maršala J., Maršala M., Vanický I., Taira Y.: *J. Comp. Neurol.* 406, 263 (1999).
12. Zhang X., Verge V., Wiesenfeld-Hallin Z., Ju G., Brecht D., Snyder S. H., Hokfelt T.: *J. Comp. Neurol.* 335, 563 (1993).

## 01 VLIV VYBRANÝCH METABOLICKÝCH AKTIVÁTORŮ A INHIBITORŮ NA PRODUKCI KAROTENOIDŮ KVASINKOU *RHODOTORULA GLUTINIS*

BRONISLAV SLOVÁK, IVANA MÁROVÁ  
a MILAN DRDÁK

Ústav potravinářské chemie a biotechnologie, Fakulta chemická, VUT Brno, Purkyňova 118, 612 00 Brno

Karotenoidy jsou skupina sekundárních metabolitů s významnými biologickými účinky a řadou průmyslových aplikací. Jsou produkovány fotosyntetizujícími bakteriemi, sinicemi, houbami a vyššími rostlinami a rovněž řadou nefotosyntetizujících bakterií, kvasinek a plísní. U fotosyntetizujících organismů slouží primárně jako ochrana před fotooxidativním působením singletového kyslíku a radikálů vznikajících za světla v přítomnosti endogenních fotosenzitivních látek. Rovněž působí i jako aktivní složky anténních fotosystémů<sup>1</sup>. V savčím organismu vykazují karotenoidy sérii pozitivních fyziologických aktivit založených zejména na jejich antioxidačním, antimutagenním a fotoprotektivním účinku, aktivně ovlivňují imunitní systém a účastní se v procesu vidění<sup>2</sup>.

Dosud bylo objeveno více než 600 derivátů karotenoidů, většina z nich obsahuje lineární uhlovodíkový řetězec se 40 atomy uhlíku a 3–15 konjugovanými dvojnými vazbami. Klíčovým bodem tvorby prvního acyklického C<sub>40</sub> řetězce fytoenu je kondenzace dvou molekul C<sub>20</sub>-intermediátu: geranylgeranyl-pyrofosfátu (GGPP). GGPP vzniká předchozí kondenzací čtyř C<sub>5</sub>-izoprenoidních jednotek vznikajících v univerzální biosyntetické dráze izoprenoidů přítomné ve všech organismech. Konverze dvou molekul GGPP na fytoen je první specifickou reakcí biosyntézy karotenoidů. Následná série desaturačních a cyklizačních reakcí vede ke konverzi fytoenu na cyklické karotenoidy, jako je α- a β-karoten. V prvním kroku probíhá neenzymová izomerizace 15,15'-*cis*-fytoenu, následovaná desaturací za vzniku lykopenu katalyzovanou fytoendesaturasou. Lykopen je typický acyklický karoten využívaný jako výchozí metabolit pro biosyntézu ostatních karotenoidů. Počáteční reakce biosyntézy karotenoidů jsou společné pro všechny karotenogenní organismy a vycházejí z obecné dráhy biosyntézy izoprenoidů. V dalších fázích probíhají různorodé druhově specifické dráhy vzniku cyklických a acyklických karotenů a xantofylů<sup>1,3</sup>.

Průmyslová kvasinka *Rhodotorula glutinis* používaná zejména k obohacení krmných směsí je producentem α- a β-karotenu a oxidovaných derivátů torulenu a torularhodinu<sup>4</sup>. K maximální produkci pigmentů dochází ve stacionární fázi<sup>5</sup>. Biosyntéza karotenoidů u *R. glutinis* dosud nebyla detailně objasněna, i když lze předpokládat řadu analogií s jinými oxygenními karotenogenními organismy. Biochemický popis jednotlivých biosyntetických kroků je značně komplikován hydrofobní povahou membránově vázaných enzymů účastnících se konverze fytoenu na barevné karotenoidy. Cílem předložené práce je přispět k objasnění klíčových enzymových reakcí a jejich regulace prostřednictvím studia vlivu přísady vybraných metabolických aktivátorů (NADP, NADPH, NADH, ATP, methionin) a inhibitorů (difenylamin, kyselina nikotino-

vá) do kultivačního média na množství a složení produkovaných karotenoidů, jejich prekurzorů a souvisejících metabolitů (ergosterol). Lipofilní pigmenty a steroidy byly extrahovány z buněčných membrán kvasinek, identifikovány a kvantifikovány za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reversní fázi<sup>6</sup>.

Většina specifických enzymů biosyntézy karotenoidů (fytoendesaturasa, hydroxylasy, epoxidasy) vyžaduje pro svou aktivitu přítomnost kyslíku, který je nejdůležitějším esenciálním faktorem pro produkci pigmentů u kvasinky *R. glutinis*. Z testovaných aktivátorů nejvýraznější aktivační účinek na produkci všech sledovaných karotenoidů (2,8× více β-karotenu než v kontrolní kultuře), směsi jejich prekurzorů i ergosterolu (až 2000× vyšší produkce) vykazoval NADPH (0,1–0,5 mM). Důvodem je jeho esenciální účast při katalýze několika klíčových enzymových reakcí: jednak je kofaktorem HMG-CoA-reduktasy, enzymu katalyzujícího rychlost limitující krok biosyntézy izoprenoidů, jeho přítomnost je dále nezbytná pro činnost některých fytoendesaturas a hydroxylas. Méně výrazný aktivační účinek vykazoval i ATP (0,1 mM), především jako kofaktor enzymů zapojených v počátečních fázích biosyntézy – konverze mevalonátu na izopentenylidifosfát. Vyšší koncentrace ATP v médiu (0,5 mM) měla za následek paradoxně sníženou produkci β-karotenu, což může být způsobeno buď soutěží o Mg<sup>2+</sup> mezi kinasami a fytoensyntasou (obě vyžadují účast Mg<sup>2+</sup> při katalytické aktivitě), nebo kompetitivní inhibicí některých enzymů. Jistý aktivační účinek vykazoval i NADP, který se podílí na katalytickém působení fytoendesaturasy a lykopenycklasy.

Z testovaných inhibitorů pouze difenylamin (30–150 μM) vykazoval reversibilní inhibici biosyntézy karotenoidů, doprovázenou sníženou produkcí biomasy, akumulací fytoenu a asi 10× vyšší produkcí ergosterolu ve srovnání s kontrolou. Difenylamin tedy pravděpodobně působí jako nekompetitivní inhibitor fytoendesaturasy a současně ovlivňuje genovou expresi. Kyselina nikotinová nevykazovala výrazný inhibiční efekt na množství produkovaných karotenoidů, její inhibiční účinek na lykopenycklasu měl však za následek akumulaci lykopenu v membránách

Karotenoidy jsou komerčně velmi zajímavé produkty a proto rostou snahy dosáhnout u produkujících organismů maximální výtěžky. Kromě optimalizace kultivačních podmínek, složení média včetně přísady vhodných aktivátorů jsou vyvíjeny nové strategie založené na použití metod genového inženýrství, které mohou vést k několikanásobnému zvýšení množství přirozeně produkovaných karotenoidů.

## LITERATURA

1. Armstrong G. A., Hearst J. E.: *FASEB J.* 10, 228 (1996).
2. Canfield L. M., Forage J. W., Valenzuela J. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 260 (1992).
3. Misawa N., Shimada H.: *J. Biotechnol.* 59, 169 (1997).
4. Kocková-Kratochvílová M. a kol.: *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy*. str. 190. SNTL, Bratislava 1982.
5. Márová I., Slovák B., Očenášková J.: *1<sup>st</sup> Czech-Swiss Symposium of Advanced Biotechnology, Book of Abstracts*, str. 72. Prague 1999.
6. Márová I., Slovák B., Bílková H., Očenášková J., Čvančarová P.: *Chem. Papers* 53(3), 174 (1999).

## 02 DETEKCE PRODUKCE ANTIFUNGÁLNÍCH LÁTEK BAKTERIEMI RODU *LACTOBACILLUS*

JANA CHUMCHALOVÁ, MAGDALÉNA VLKOVÁ,  
MILADA PLOCKOVÁ, JITKA STILES  
a EVA ŠVIRÁKOVÁ

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha, Technická 5,  
166 28 Praha 6, Česká republika

Bakterie mléčného kvašení jsou intenzivně používány pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků. Během fermentace dochází v substrátu k snížení obsahu dostupných sacharidů a vzniká řada nízkomolekulárních organických látek (např. kyselina mléčná a octová), které vykazují antimikrobiální aktivitu<sup>1</sup>. Ačkoliv většina kontaminujících bakterií je inhibována z důvodu jejich citlivosti k nízkému pH, mohou v těchto výrobcích růst kvasinky a způsobovat nežádoucí změny<sup>2</sup>. Škodlivé působení kvasinek v mlékárenském průmyslu se projevuje především v sýrech a fermentovaných mléčných výrobcích, které jsou obohaceny ovocem, cukrem nebo ořechovými jádry. Tyto složky bývají zdrojem kontaminace kvasinek a zároveň poskytují výživné látky pro jejich růst. Kvasinky způsobují tvorbu plynů, nežádoucí chuť a vůni, změnu barvy nebo konzistence<sup>3</sup>. Antibakteriální vlastnosti bakterií mléčného kvašení spojené s produkcí organických kyselin, peroxidu vodíku a bakteriocinů jsou v literatuře dobře zdokumentovány<sup>4</sup>. Naopak antifungální potenciál bakterií mléčného kvašení je publikován méně.

Cílem práce bylo zjistit, zda bakterie rodu *Lactobacillus* vykazují inhibiční účinky na kvasinky *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* LCC 255 a *K. marxianus* var. *marxianus* LCC 269. V druhé části práce byly testovány podmínky stanovení a produkce antifungálních látek. Ke studiu byla použita metoda detekce antifungální aktivity na mléčném agarovém mediu podle Suzukiho<sup>5</sup> s aplikací živých buněk bakterií vykultivovaných v MRS bujonu.

Bylo zjištěno, že 9 z 10 kmenů laktobacilů vykazovalo antifungální aktivitu na obě kvasinky. Nejintenzivněji inhibovaly růst obou kvasinek *Lactobacillus rhamnosus* VT1 a *L. acidophilus* D10. Jako citlivější se projevila kvasinka *K. marxianus* var. *marxianus* LCC 269 (po 48 h kultivace na šikmém agaru), která byla použita k dalšímu studiu. Jako modelový produkční kmen byl vybrán *L. rhamnosus* VT1. Testování probíhalo při kultivační teplotě 30 °C, kdy docházelo k produkci antifungálních látek. Při teplotě 25 °C a 37 °C inhibice nebyla zaznamenána.

V další části práce byl sledován vliv přídavku dusíkatých látek (kvasničný autolyzát, trypton, pepton a masový výtažek o koncentraci 0,5 hm.%) na produkci antifungálních metabolitů. Bylo zjištěno, že k maximální stimulaci produkce látek docházelo při přídavku peptonu a masového výtažku. Při přídavku peptonu do mléka o koncentraci vyšší než 1 hm.% byla produkce ve srovnání stejná s kontrolním vzorkem, a při koncentraci 3 hm.% peptonu docházelo k potlačení produkce inhibitorů. V případě masového výtažku byla zaznamenána maximální produkce za použití koncentrace 1 hm.%, a opět při použití vyšší koncentrace byla produkce stejná s kontrolním vzorkem.

Závěrem je možné konstatovat, že byly nalezeny bakte-

riální kmeny vykazující antifungální aktivitu, jejichž produkce může být zvýšena přídavkem dusíkatých látek.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GA ČR 104/98/P058.

## LITERATURA

1. Blom H., Mortvedt C.: *Biochem. Soc. Trans.* 19, 694 (1991).
2. Deák T.: *Adv. Appl. Microbiol.* 36, 179 (1991).
3. Jakobsen M., Narvhus J.: *Int. Dairy J.* 5, 1 (1996).
4. Hoover D. G., Steenson L. R.: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press Inc., San Diego 1993.
5. Suzuki I., Nomura N., Morichi T.: *Milchwissenschaft* 46, 635 (1991).

## 03 ENZYME IMMUNOASSAY OF DDT AND $\alpha$ -ENDOSULFAN

IGOR HOCHEL, BARBORA MIČKOVÁ,  
PAVEL RAUCH, PETR MUSIL,  
and PETR BABINEC

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of  
Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech  
Republic

Undirect competitive enzyme immunoassay of DDT and  $\alpha$ -endosulfan, based on polyclonal antibodies has been deve-

Table I  
The cross-reactivity of polyclonal rabbit antibodies

Antigen	Cross-reactivity [%]	
	anti-DDT IgG	anti- $\alpha$ -endosulfan IgG
4,4'-DDT	100	>1
2,4'-DDT	12	>1
4,4'-DDE	186	>1
2,4'-DDE	1	>1
Methoxychlor	36	>1
Lindan	>1	>1
Eldrin	>1	>1
Aldrin	>1	>1
Mirex	>1	>1
Chlordecon	>1	>1
Alodan	>1	>1
Telodrin	>1	>1
Perthan	>1	>1
Heptachlor	>1	>1
$\alpha$ -Endosulfan	>1	100
$\beta$ -Endosulfan	>1	138
Endosulfansulfat	>1	300
Endosulfanalcohol	>1	86
Endosulfanether	>1	208

loped. The detection limit  $1.0 \text{ nmol.l}^{-1}$  (ELISA of DDT) and  $2.3 \text{ nmol.l}^{-1}$  (ELISA of  $\alpha$ -endosulfan) was found after optimization of both immunochemical methods. Non-specific interactions were eliminated by saturation of solid phase with 2 % human serum albumin. The cross-reactivity of antibody against DDT with 2,4'-DDE, 2,4'-DDT, Methoxychlor and 4,4'-DDE was 1 %, 12 %, 36 % and 186 % respectively. Very high affinity of anti- $\alpha$ -endosulfan antibody to  $\beta$ -endosulfan, endosulfanether, endosulfansulfat and endosulfanalcohol was observed (Tab. I). Shared cross-reactivity of tested antibody with endosulfanlacton was observed. With respect to limited solubility of analytes in water the influence of different organic solvents on the sensitivity of the assay was tested. The enzyme immunoassay has been optimized for the chemiluminescent detection of the antigen-antibody complex.

*The project Development of Enzyme Immunoassay for the Determination of Organochlorine Pesticides No. 525/99/0271 is supported by Grant Agency of the Czech Republic.*

#### 04 DEVELOPMENT OF ELISA AND PCR METHODS FOR DETECTION OF SALMONELLA ENTERITIDIS

IGOR HOCHEL, GABRIELA JENÍKOVÁ,  
KATEŘINA DEMNEROVÁ,  
and JARMILA PAZLAROVÁ

*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic*

Competitive ELISA estimation based on application of polyclonal mice antibodies to somatic antigen O:9,12 was developed. The optimization of this protocol is reported. The optimal concentration of immobilized somatic antigen O:9,12 was found to be  $4.9 \times 10^4 \text{ cells.ml}^{-1}$ , optimal concentration of mice IgG was  $6.25 \text{ mg.ml}^{-1}$  and the optimal concentration of peroxidase labelled antibody to mice IgG was  $8 \text{ mg.ml}^{-1}$ . The tested antibody exhibited neither cross reactions with chosen

Table I

The determination of *Salmonella enteritidis* in food samples

Sample	Quantitative analysis				
	(n = 6)		ELISA	TECRA	IMS-PCR
	ELISA [cells.ml <sup>-1</sup> ± s.o.]	cultivation [cells.ml <sup>-1</sup> ]			
Egg melange	$6.6 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$	$5 \times 10^7$	+	++	+
Egg melange	0	0	-	-	-
Mackerel	$6.5 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^7$	$5 \times 10^7$	+	++	+
Mackerel	0	0	-	-	-
Pork mince meat	$3.3 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$	$5 \times 10^7$	+	+	+
Pork mince meat	0	0	-	-	-
Potato salad	0	0	-	-	-
Potato salad	0	0	-	-	-
Pepton water	$1.3 \times 10^7 \pm 5.7 \times 10^6$	$5 \times 10^7$	++	+++	+

strains (serotypes) of salmonellas group 04 (B), 07 (C<sub>1</sub>), 08 (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), nor with members of *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* and non-fermenting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Different colorimetric substrates were tested. The detection limit obtained was  $4.8 \times 10^5 \text{ cells.ml}^{-1}$ ,  $5.8 \times 10^5 \text{ cells.ml}^{-1}$ ,  $2.1 \times 10^5 \text{ cells.ml}^{-1}$  for ABTS, OPD and TMB respectively. The method has been adapted for chemiluminescent detection of the antigen-antibody complex. The application of commercial chemiluminescent substrates increased the sensitivity of *S. enteritidis* detection up to 3 times. Competitive ELISA tested on model samples led to results comparable with standard cultivation techniques for *Salmonella spp.* and with commercial kit TECRA® UNIQUE™ SALMONELLA (Table I).

The PCR method for *S. enteritidis*, based on the oligonucleotide primers invA and spvC has been tested. The sensitivity of this method was  $1 \times 10^7 \text{ cells.ml}^{-1}$ .

#### 05 ZRÝCHLENIE DŔKAZU SALMONEL V POTRAVINÁCH POMOCOU POLYMERÁZOVEJ REŤAZOVEJ REAKCIE

HANA DRAHOVSKÁ<sup>a</sup>, JÁN TURŇA<sup>a</sup>,  
LUBICA PIKNOVÁ<sup>b</sup> a TOMÁŠ KUCHTA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava,* <sup>b</sup>*Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovenská republika*

Salmonely sú fakultatívne anaeróbne baktérie patriace do čeľade *Enterobacteriaceae*. Všetky druhy a sérotypy patriace do rodu *Salmonella* sú považované za patogénne pre človeka. Zdrojom nákazy býva kontaminovaná voda a potraviny. Na zabezpečenie zdravotnej nezávadnosti je potrebné mať spoľahlivú metódu na dôkaz salmonel v potravinách. Klasické metódy detekcie založené na kultivácii baktérií majú veľmi dobrý detekčný limit a selektivitu, ale definitívne výsledky sú známe až za 5–6 dní. Spomedzi v súčasnosti dostupných



alternatívnych rýchlych metód patria k najperspektívnejším metódy založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR). Podmienkou ich použiteľnosti je však splnenie požiadavky 100%-nej záchytnosti (0%-nej falošnej negativity), 100%-nej selektivity (0%-nej falošnej pozitivity) a detekčného limitu  $10^0$  KTJ/25 g potraviny.

V našej práci sme navrhli primery na PCR detekciu salmonel orientované na gén *fimC*, kódujúci chaperone, ktorý sa zúčastňuje syntézy bakteriálneho fimbria typu 1. Na základe sekvencií prístupných v DNA databázach sme navrhli 4 primery (2 konzervatívnejšie, ktoré amplifikovali DNA z rodov *Salmonella* a *Citrobacter* a 2 špecifické pre *Salmonella spp.*).

Špecifické primery na detekciu salmonel, označené 212/500, sme testovali na širokom spektre kmeňov. Bolo použitých 40 sérotypov rodu *Salmonella* (celkovo 90 kmeňov) a 25 druhov iných baktérií (35 kmeňov). Výsledkom bola špecifická amplifikácia produktu u všetkých salmonelových vzoriek, žiadny produkt nevznikal v PCR s inými bakteriálnymi DNA, vrátane rodov *Citrobacter* a *Enterobacter*. Pozitívnu reakciu dávali aj 2 kmene *S. gallinarium-pullorum*, aj keď tento sérotyp neexprimuje fimbrium typu 1.

Detekčný limit PCR, ktorý sme stanovili analýzou desiatkových riedení kultúry *Salmonella typhimurium*, bol  $10^4$  KTJ/ml. Na vylúčenie falošne negatívnych výsledkov v prípade inhibície PCR sme použili vnútorný štandard, ktorý pri amplifikácii s primermi 212/500 poskytoval väčší DNA produkt<sup>1</sup>. Detekčný limit a relatívnu správnosť celej metódy sme stanovili analýzou potravín umelo kontaminovaných desiatkovými riedeniami kultúry *S. enteritidis*. Na rozmnoženie salmonel pred PCR sme použili trojstupňovú kultiváciu v selektívnych a neselektívnych médiách<sup>2</sup>. Tento detekčný systém umožňuje dôkaz salmonel v potravinách za 52 hodín. Na základe získaných výsledkov bola navrhnutá detekčná súprava pre potravinárske mikrobiologické laboratória.

#### LITERATÚRA

1. Drahovská H., Turňa J., Boháčová V., Píknová L., Kuchta T.: Bulletin potravinárskeho výskumu 38, 95 (1999).
2. Aabo S., Andersen J. K., Olsen J. E.: Lett. Appl. Microbiol. 21, 180 (1995).

Table I

Characterisation of antiMAPs antibodies (Experimental conditions: indirect enzyme immunoassay, microplate coated by MAP; in incubation mixture: as competitor the same MAP and corresponding antiMAP antibody.)

Antigen-antibody competition	Concentration of coating MAP [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Dilution of antiMAP antibody	Upper asymptote	Low asymptote	$I_{50}$ [ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Note
MAP1-antiMAP1	10	1:1,000	0.50	–	high	poor competition
MAP2-antiMAP2	0.5	1:1,000	1.35	0.20	265	good competition
MAP3-antiMAP3	–	1:1,000	–	–	–	no interaction
MAP4-antiMAP4	0.1	1:2,000	1.70	0.05	105	good competition
MAP5-antiMAP5	5	1:1,000	0.65	–	high	poor competition
MAP6-antiMAP6	0.33	1:1,500	1.50	0.15	160	good competition
MAP7-antiMAP7	0.8	1:2,000	1.80	–	–	no interaction
MAP8-antiMAP8	–	1:1,000	–	–	–	no interaction
MAP9-antiMAP9	0.8	1:1,500	1.70	–	–	poor competition
MAP10-antiMAP10	–	1:1,000	–	–	–	no interaction

#### 06 CHARACTERISATION OF ANTIBODIES TO PEPTIDES REPRESENTING VIRULENCE PROTEINS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

LUDMILA KARASOVÁ<sup>a</sup>, JAKUB DOLEŽAL<sup>a</sup>, GARY BRETT<sup>b</sup>, PAVEL RAUCH<sup>a</sup>, and GARY WYATT<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, <sup>b</sup>Institute of Food Research, Norwich NR4 7UA, U.K.

The overall objective is to develop rapid, specific test methods for the immunochemical detection of *Listeria* in foods, with the aim of introducing appropriate quality control into food production processes.

*Listeria monocytogenes* has a multi-level mechanism of pathogenesis involving a number of proteins. The target proteins in this study are the internalins and the actin-assembly protein. We considered several criteria when selecting peptides to represent the virulence of these proteins: *i*) uniqueness of primary sequence of the peptide – must be present only in *L. monocytogenes*, and not in other bacteria, in particular other *Listeria* species; *ii*) surface exposure of the peptide – if the sequence is not on the protein surface, then it is unlikely that antibodies will bind to the whole protein; *iii*) secondary structure of the peptide – peptides containing, for example, turns or coils, are more likely to stimulate an immune response than straight chain structures (provided, of course, that the synthetic peptide in isolation adopts the same conformation as in the parent protein); *iv*) antigenicity of the peptide – this is linked to *iii*), but must include consideration of other factors like the hydrophilicity of the constituent amino acids.

As the chosen peptides are not immunogenic themselves, multiple antigenic peptides (MAPs) based on a lysine core were prepared. Eight-branch MAPs with the chosen oligopeptides have molecular weights in excess of 10,000 Daltons and are thus immunogenic without further coupling. For single peptides, as well as for MAPs, solid phase peptide synthesis was used. After synthesis, the MAPs (No. 1–10) were lyophi-

lised (yields were in the region of 5–15 mg) and used for rabbit polyclonal antibody production.

Novel antibodies to peptide sequences representing *L. monocytogenes* pathogenicity proteins were raised. Antisera obtained were purified by affinity chromatography. Resulting immunoglobulin (IgG) fractions were lyophilised with lactose in ratio 1:1 (w:w) and used in all experiments.

IgG fractions against MAP 1, 2, 4, 5, 6, and 9 specifically bound these peptides in indirect competitive enzyme immunoassay (ELISA). Antibodies against MAP 2, 4 and 6 have showed the best affinities to their corresponding antigens (Table I).

Cross reactivities of all animals antibodies with MAPs were tested. The lowest cross reactivity was found for anti-MAP 4, only 7 % with MAP 7. antiMAP 2 cross reacts with MAP 4 (19 %) and antiMAP 6 with MAP 2 (87 %) and MAP 7 (18 %). The highest cross reactivity possesses antiMAP 1, which interacts very well with MAP 9 (154 %) and MAP 2 (114 %).

The interactions of prepared antibodies with different listeria species were followed in indirect competitive enzyme immunoassay (ELISA) format. Surprisingly, only antiMAP 1 and MAP 9 recognize *L. monocytogenes*, while all other antibodies do not bind microbial cells.

*This work is supported by the European Community grant: ERBIC No. 15CT98-0902.*

#### 07 <sup>13</sup>C AND <sup>1</sup>H NMR STUDY OF CELLULOSE DEGRADATION BY *FIBROBACTER SUCCINOGENES* S85

MÁRIA MATULOVÁ<sup>a,c</sup>, GENEVIÉVE GAUDET<sup>b</sup>, EVELYN FORANO<sup>b</sup>, and ANNE-MARIE DELORT<sup>a</sup>

<sup>a</sup>SEESIB, UMR 6504 Université Blaise Pascal – CNRS, 63177 Aubière, France, <sup>b</sup>Laboratoire Microbiologie, INRA, Theix, 63122 Saint-Genès-Champagnelle, France, <sup>c</sup>Institute of Chemistry, Slovak Academy of Science, 842 08 Bratislava, Slovak Republik

Microbial cellulases and hemicellulases are widely used in different industries, but also in the treatment of fibrous feeds in the non-ruminant livestock industry<sup>1</sup>. *Fibrobacter succinogenes* S85, a strictly anaerobic cellulolytic rumen bacterium, is very efficient in degrading lignocellulosic substrates and could be used to develop a biotechnological process for the treatment of wastes. The enzymatic equipment of *F. succinogenes* includes a very efficient cellulolytic system, ferulic acid and acetylxlane esterases, arabinofuranosidases, xylanases and glucuronidases<sup>2-5</sup>. An estimation of metabolic fluxes in *F. succinogenes* is necessary to direct bacterium metabolism towards the production of biomass and enzymes of interest to create a bioreactor of a high performance. In this context it is of special interest to study *F. succinogenes* metabolism in detail.

The degradation of unlabelled cellulose synthesised by *Acetobacter xylinum* was studied indirectly, in the presence of

[1-<sup>13</sup>C] glucose, by estimation of isotopic dilution of final bacterial metabolites (glycogen, succinate, acetate). Two experimental approaches were used to quantify this isotopic dilution: *In vivo* <sup>13</sup>C NMR experiments connected to enzymatic assays of total metabolites and <sup>13</sup>C-filtered spin echo difference <sup>1</sup>H NMR experiments performed on the incubation medium<sup>6,7</sup>. Thus the contribution of endogenous glycogen, the reversal of the succinate pathway and the utilisation of exogenous substrates (glucose, cellulose) to the synthesis of final metabolites could be evaluated<sup>8</sup>.

During the pre-incubation period of *F. succinogenes* cells with cellulose fibres, some cells (“non-adherent”) did not attach to the solid material. Results for “adherent” cells showed that about one fourth of the glucose units entering *F. succinogenes* metabolism originated from cellulose degradation. A huge reversal of succinate metabolism pathway and production of large amounts of unlabelled acetate, which was observed during incubation with glucose only, was found to be much decreased in the presence of solid substrate. The synthesis of glucose-6-phosphate was slightly increased in the presence of cellulose. Results clearly showed that “non-adherent” cells were able to metabolise glucose very efficiently. Consequently their metabolic state was not responsible for their “non adherence” to cellulose fibre.

#### REFERENCES

1. Selinger L. B., Forsberg C. W., Cheng K. J.: *Anaerobe* 2, 263 (1996).
2. Chesson A., Forsberg C. W., in: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Hobson P. N., Stewart C. S., ed.), p. 329. Blackie Academic and Professional, London 1997.
3. McDermit K. P., McKenzie C. R., Forsberg C. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 127 (1990).
4. Smith D. C., Forsberg C. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3552 (1991).
5. Malburg L. M. Jr, Smith D. C., Schellhorn H. E., Forsberg C. W.: *J. Appl. Bacteriol.* 75, 564 (1993).
6. Matheron C., Delort A. M., Gaudet G., Forano E.: *Can. J. Microbiol.* 42, 1091 (1996).
7. Matheron C., Delort A. M., Gaudet G., Forano E., Liptaj T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 74 (1998).
8. Bibollet X., Bosc N., Matulova M., Delort A. M., Gaudet G., Forano E.: *J. Biotechnol.* 77, 37 (2000).

#### 08 STANOVENÍ MOČOVINY V MLÉČE POMOCÍ IMOBILIZOVANÉ UREASY KONDUKTOMETRICKY

MILAN JÍLEK<sup>a</sup>, LUDMILA ZAJONCOVÁ<sup>b</sup>  
a PAVEL PEČ<sup>b</sup>

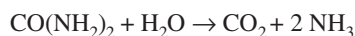
<sup>a</sup>Služba laboratořím, V kopci 132, 789 69 Postřelmov, <sup>b</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Koncentrace močoviny v mléce je významným ukazatelem výživového stavu krav z hlediska dusíkato-energetické

ké vyváženosti krmení. Při nedostatečném příjmu sacharidů nejsou dusíkaté látky v předžaludku krav dostatečně využity, játra syntetizují z resorbovaného amoniaku více močoviny. Ta se vylučuje mlékem a močí. Rovněž při zkrmování velkého množství dusíkatých látek se koncentrace močoviny zvyšuje. Z údajů o koncentraci močoviny a obsahu bílkovin v mléce lze vyvodit závěry týkající stanovení optimální krmné dávky.

Metody pro stanovení močoviny<sup>1,2</sup> lze rozdělit do dvou skupin, a to na metody enzymatické využívající ureasu a ostatní analytické metody. V laboratorní praxi se ještě stále užívají málo specifické fotometrické metody založené na reakci močoviny s diacetylmonoxinem v přítomnosti thiosemikarbazidu a železitých iontů nebo na reakci močoviny s Ehrlichovým činidlem. V řadě laboratoří pracují automatické analyzátoři na principu konvenční infračervené spektroskopie, které registrují záření specifických vlnových délek, měřících absorpci močovinných molekul. V této souvislosti Herre<sup>3</sup> uvádí, že pouze každý druhý výsledek je „správný“. Lepší shody bylo dosaženo proměřením celého infračerveného spektra s následným využitím Fourierových transformací<sup>4</sup>.

Enzymatické metody stanovení močoviny jsou založeny na ureolytické reakci, kterou katalyzuje ureasa:



a vyúsťují do nejrůznějších koncovek – např. fotometrie, fluorimetrie, diferenční pH-metrie nebo diferenční konduktometrie.

Prezentovaná plně automatická metoda zvaná UREA-KVANT využívá novou konstrukci reaktoru s fixovanou ureasou pro průtočnou analýzu močoviny v mléce uzpůsobenou pro diferenční konduktometrii na výsledkovém výstupu. Ureasa (EC 3.5.1.5) byla imobilizována na vnitřní povrch polyamidové hadice podle Surdarama<sup>5</sup>.

Analýza probíhá tak, že vzorek po naředění a vytemperování je nasát do enzymového reaktoru. Po ustálení chemických a elektrických dějů je nasávání vzorku zastaveno. V této fázi se v enzymovém reaktoru začínají hromadit produkty enzymové hydrolyzy močoviny, kterou katalyzuje ureasa, přítomná na vnitřní vrstvě reaktoru. Rychlost vzrůstu vodivosti je v přímém vztahu ke koncentraci močoviny ve vzorku. Jako užitečný signál byly vyhodnocovány plochy pod přímkou nárůstu vodivosti v čase 45–60 s od nasávání vzorku. Ke kalibraci jsou použity umělé močovinné standardy (v počtu 5). Tímto postupem lze analyzovat 80 až 350 vzorků (dle konstrukce) za hodinu. Metoda splňuje základní požadavek kladený na referenční metody, a to specifickou. Opakovatelnost analýz na sérii 20 stejných vzorků je garantována variačním koeficientem menším jak 1,5 % a variačním rozpětím pod 2,5 mg/100 ml při hodnotách 15–60 mg/100 ml.

Nový postup UREA-KVANT vykázal výbornou věrohodnost výsledků a vzhledem k použitému principu lze tuto metodu považovat potenciálně za referenční.

## LITERATURA

- Hanuš O., Ficnar J., Jedelská R., Kopecký J., Beranová A., Gabriel B.: *Vet. Med. Czech* 40, 387 (1995).
- Hanuš O., Ficnar J., Kopecký J., Jedelská R., Beranová A., Havlíčková A.: *Výzkum v chovu skotu* 2, 7 (1997).
- Herre A.: *Top Agrar* 2, R10 (1998).
- Berlec M., Golc-Teger S.: *2. Slovenian Congress „Milk and Dairy Products“ Portorož*, PB-18, 63 (1999).
- Surdaram P. V.: *Biochem. J.* 179, 445 (1979).

## 09 EFFECT OF VERY HIGH BROMIDE INTAKE ON IODINE METABOLISM IN THE RAT

STANISLAV PAVELKA<sup>a,b</sup>, ARNOŠT BABICKÝ<sup>c</sup>,  
and MILOSLAV VOBECKÝ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, 611 37 Brno, <sup>b</sup>Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, <sup>c</sup>Institute of Analytical Chemistry, ASCR, 142 20 Prague 4, Czech Republic

In the scope of our previous experiments in which we studied mutual bromine and iodine interaction in tissues of rats, no influence of a moderately increased bromide concentration in the diet on the biological half-life of iodine was observed<sup>1</sup>. However, in our further experiments<sup>2</sup>, an extremely high bromide intake accelerated the elimination of iodine from the thyroid. In the present study we intended, therefore, to follow the influence of an enhanced bromide intake on the uptake of <sup>131</sup>I by the thyroid and various organs and tissues of rats, on the magnitude of the whole-body biological half-life of iodine and on the body weight and prosperity of rats with the help of radionuclide tracer techniques. Because the biological behaviour of bromide, above all its toxicity, depends on the state of iodine supply in the organism<sup>3,4</sup>, we decided to perform this study both under the conditions of sufficient iodine supply, and iodine deficiency.

The animals were fed a standard laboratory diet or a special low-iodine diet (Altromin C 1042) in combination with 0, 50, 500, and 5 000 mg Br<sup>-</sup> per litre of drinking water. The effects of the highest dose of bromide manifested themselves above all in the thyroid, stomach, and skin while the effects of lower doses were only marginal. Besides the well-known signs of hypothyroidism, caused by high amounts of bromide, we have also confirmed the observation that bromide toxicity is dependent upon the state of iodine supply (i.e., it is much more pronounced with iodine deficiency).

The most pronounced effects of a high bromide level in the organism of the experimental animals on the iodine metabolism were observed in their thyroids. Very high bromide intake: *i*) decreased the amount of radioiodide accumulated in the thyroid; *ii*) changed the proportion between the amount of iodine retained in the thyroid and the total amount of absorbed iodine; *iii*) significantly shortened the biological half-life of iodine in the thyroid – from approximately 101 h and 92 h in control animals on the iodine sufficient and iodine deficient diet, respectively, to about 33 h and 30 h, respectively; *iv*) changed the time-course (added a further phase) of iodine elimination from the body.

The observed reduction of the food intake and consequently of the body weight and development in rats fed a diet with

the addition of the highest bromide concentration could be explained by the assumption that higher concentrations of bromide in stomach, and hydrobromic acid there possibly produced, could interfere with digestive processes or do harm to stomach. Bromide also inhibited transport of iodide to skin, which represented an important iodide depot due to its large mass (about 20 % of rat body weight).

We conclude that a high level of bromide in the organism can obviously influence the iodine metabolism in two parallel ways: by a competitive inhibition of iodide accumulation in the thyroid, and by accelerating the iodine excretion by kidneys.

*This work was supported by the grants from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (No.*

*A7011813) and the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (No. NJ6109-3).*

#### REFERENCES

1. Vobecký M., Babický A., Lener J.: *Biol. Trace Elem. Res.* 55, 215 (1996).
2. Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J., in: *Mengen- und Spurenelemente* (Anke M., et al., ed.), p. 205. Verlag Harald Schubert, Leipzig 1999.
3. Buchberger W., Holler W., Winsauer K.: *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 4, 25 (1990).
4. Pavelka S., Babický A., Vobecký M., Lener J., in: *Industrial Toxicology '99* (Romančík V., ed.), p. 224. Slovak Technical University, Bratislava 1999.



## 01 STEREOCHEMICKÉ ASPEKTY METABOLISMU LÉČIV

VLADIMÍR WSÓL, BARBORA SZOTÁKOVÁ,  
LENKA SKÁLOVÁ, RADIM KRÁL  
a LUCIE BIMKOVÁ

*Katedra biochemických věd, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové*

V posledních letech je kladen stále větší důraz na čistotu farmaceutických preparátů. Cílem je vytvářet farmaceutické preparáty nejen účinnější, ale zároveň i bezpečnější. Proto se setkáváme s přísnějšími kritérii při registraci farmaceutických přípravků. K novému posouzení čistoty preparátů velkou měrou přispěl nový pohled na stereoizomerní složení farmak, takže na racemický přípravek nyní pohlížíme jako na preparát obsahující dvě nebo více substancí (v závislosti na počtu stereogenních center).

Skutečnost, že jednotlivé enantiomery léčiva nebo jiného xenobiotika mají odlišné osudy v organismu, popřípadě rozdílné účinky, není překvapivá, protože živý organismus obsahuje množství chirálních biopolymerů jako jsou proteiny, buněčné povrchy, receptory, enzymy aj., které s příslušnými enantiomery vytváří rozdílné interakce. Lze říci, že jakýkoliv aktivní farmakologický proces má pravděpodobně enantioselektivní nebo enantiospecifické rysy. Odlišnému farmakodynamickému účinku enantiomerů chirálního léčiva již byla věnována značná pozornost a v literatuře existuje více přehledných článků, ve kterých se autoři snaží zmapovat účinky eutomeru a jeho stereoizomeru – distomeru<sup>1,2</sup>. Novější poznatky svědčí o rozdílech nejen ve farmakodynamickém účinku stereoizomerů, ale také o významných diferencích ve farmakokinetickém profilu jednotlivých forem<sup>3</sup>. Tyto rozdíly mohou být jak kvantitativního, tak kvalitativního charakteru a někdy bývají neprávem opomíjené. Mohou být způsobeny odlišným chováním eutomeru a distomeru ve všech fázích farmakokinetického procesu (absorpce, distribuce, exkrece). Zřejmě nejvíce popsanou částí farmakokinetické fáze je metabolická přeměna chirálních látek. Ze stereochemického pohledu lze na metabolické přeměny xenobiotik pohlížet z hlediska typu přeměn následovně:

1. Přeměny látek prochirálních na chirální, u kterých je prochirální centrum symetrické molekuly přednostně metabolizováno za vytvoření jednoho ze dvou možných enantiomerů.
2. Transformace látek chirálních na chirální, ve kterých jsou dva enantiomery xenobiotika rozdílně metabolizovány na jiném místě molekuly, než se nachází jejich centrum chiralit.
3. Přeměny látek chirálních na diastereoizomerní, u kterých je do molekuly xenobiotika vneseno druhé chirální centrum, buď přeměnou prochirálního centra v první fázi biotransformace, nebo konjugací s chirálním konjugáčním substrátem.
4. Transformace látek chirálních na nechirální, kde substrát podléhá přeměně v místě chirálního centra a tato modifikace vede ke ztrátě asymetrie.
5. Chirální inverze látek, u kterých jeden enantiomer xenobiotika podléhá biochemické konverzi na svůj antipod, aniž by došlo k jakémukoli další změně původní molekuly.

Z historického hlediska mohou být reakce biotransformace látek rozděleny do dvou skupin. Do první skupiny náleží reakce 1. fáze metabolismu a druhou skupinu tvoří reakce 2. fáze metabolismu. Je třeba si uvědomit, že k selektivnímu výběru určitého substrátu, nebo k stereospecifické tvorbě konkrétního stereoizomeru dochází v obou fázích metabolismu.

Jedním z nejvýznamnějších aspektů metabolismu xenobiotik je rozdílný metabolismus substrátů u různých species. Mezi druhové rozdíly v metabolismu chirálních xenobiotik mohou být obdobně jako v metabolismu nechirálních substrátů kvantitativní nebo kvalitativní. V případech kvantitativního rozdílu je k přeměně látek využívána stejná metabolická cesta, pouze se liší rozsah příslušné přeměny. Kvalitativní rozdíly pak představují odlišné metabolické dráhy, kterými jsou původní látky přeměňovány. Obdobně jako rozdíly mezidruhové, mohou také další faktory významně ovlivnit metabolickou dráhu xenobiotika. Mezi ně je především řazen vliv pohlaví, věku a rasy.

*Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 303/99/1167 a výzkumným projektem MŠMT ČR č. J13/98:111600002.*

## LITERATURA

1. Aboul-Enein H. Y., Abou Basha L. I., v: *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use* (Aboul-Enein H. Y., Wainer I. W., ed.), str. 1. John Wiley & Sons, New York 1997.
2. Ariëns E. J., v: *Chiral Separation by HPLC* (Krstilovic A. M., ed.), str. 31. John Wiley & Sons, Chichester 1989.
3. Fassihi A. R.: *Int. J. Pharm.* 92, 1 (1993).

## 02 CYTOCHROMY P-450: PODOBNOSTI A ROZDÍLY

PAVEL ANZENBACHER<sup>a</sup>,  
EVA ANZENBACHEROVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ HUDEČEK<sup>b</sup>,  
REINHARD LANGE<sup>c</sup> a PETER HILDEBRANDT<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Ústav experimentální biofarmacie, spol. prac. AV ČR a PRO. MED.CS Praha, a.s., Heyrovského 1207, 500 02 Hradec Králové 2, <sup>b</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, <sup>c</sup>INSERM Unité 128, 1919 Route de Mende, Montpellier, France, <sup>d</sup>Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Stiftstrasse 4, Mülheim, Germany

Cytochromy P-450 tvoří rozsáhlou skupinu enzymů, zařazených pod monooxygenasy (i když spektrum jejich aktivit sahá od peroxidasové aktivity po reduktasovou). Systematické třídění více než 600 známých cytochromů P-450 se opírá o podobnost primární struktury; podle její podobnosti je tato „superrodina“ enzymů rozdělena dále do rodin, podrodin až na úroveň jednotlivých forem (dříve nazývaných izoformy). Původní označení pro různé cytochromy P-450 jako izoformy nebo dokonce izoenzymy se opouští, poněvadž diverzita dějů a substrátů cytochromů P-450 toto označení nepřipouští.

Určitý důvod však pro toto označení byl: Všechny cytochromy P-450 jsou si podobné mechanismem své hlavní katalytické funkce, tj. tím, že váží (na centrální atom železa v hemu *b* molekulu kyslíku, kterou aktivují (po přijetí dvou elektronů) do té míry, že dávají vznik molekule vody a mole-

kule oxygenovaného substrátu. Monooxygenace nepolárních substrátů za vzniku hydroxyderivátů je nejčastější reakcí, zprostředkovanou těmito enzymy.

Cytochromy P-450 jsou si podobné dále celkovou strukturou své makromolekuly. U enzymů, které jsou membránovými proteiny (což je většina jaterních mikrosomálních cytochromů P-450, důležitých pro metabolismus cizorodých látek) je část molekuly na N-konci zanořena do membrány. Ostatní část makromolekuly zřejmě dodržuje celkovou podobnost s cytochromy P-450 bakteriálního původu, které jsou krystalovatelné a jejichž prostorová struktura je v řadě případů známa: Celkový tvar makromolekuly je podobný tvaru srdce, hemová skupina se nachází ve středu molekuly a substráty se vází do více či méně otevřeného (přístupného) aktivního místa.

Na této úrovni však končí úvahy o podobnosti cytochromů P-450: Ospravedlněním existence obrovského množství těchto enzymů je různost jejich substrátů, která se odráží i v různosti struktur aktivních míst.

Rozdíly mezi cytochromy P-450 lze velmi zhruba rozdělit na zásadnější a na dílčí, související především s vlastnostmi aktivních míst. Zásadnějšími rozdíly je možné rozumět odlišnosti v reakčním mechanismu a v regulaci enzymové aktivity. K prvnímu tématu je třeba uvést, že se týká zejména cytochromu P-450 2E1, u kterého se projevuje schopnost tvorby reaktivních sloučenin radikálového charakteru a jehož funkce může souviset s přeměnami ketolátek při hladovění a diabetu. Rovněž regulace enzymové aktivity prostřednictvím allosterických mechanismů se zdá být charakteristickým rysem některých cytochromů P-450, především CYP3A4.

Definujeme-li aktivní místo jako hem a jeho okolí včetně vazebného místa pro substráty, lze říci, že se aktivní místa cytochromů P-450 liší velmi podstatně. Příkladem enzymu s aktivním místem dobře definovaným, kde se nachází strukturní útvar označovaný jako „substrate access channel“ je P-450 BM-3 jehož substráty jsou mastné kyseliny. Naproti tomu jaterní mikrosomální cytochromy mají aktivní místa poměrně otevřená, což jim umožňuje přeměňovat řadu substrátů, jako jsou léčiva nebo látky znečišťující životní prostředí. Cytochrom P-450 3A4 je tím, který přeměňuje více než polovinu léčiv, u kterých byl metabolismus již poznán. Očekává se, že jeho aktivní místo bude poměrně otevřené. Podle našich studií vede vazba substrátu k většímu rozvolnění jeho struktury (k větší kompresibilitě aktivního místa). Určitá otevřenost a flexibilita aktivního místa tohoto cytochromu P-450 je doprovázena snadnou denaturací (pomocí hydrostatického tlaku) na inaktivní formu (u cytochromů P-450 označovanou jako P-420). Další z námi studovaných jaterních mikrosomálních cytochromů P-450, CYP1A2, je naproti tomu jak poměrně rigidní, tak je i odolný vůči denaturaci. Vztah mezi flexibilitou, kompresibilitou aktivního místa a denaturací není ale vůbec obecný: Právě výše zmíněný cytochrom P-450 BM-3 má sice nejvíce flexibilní aktivní místo, ale je současně velmi odolný vůči denaturaci.

Další, jemnější rozdíly ve struktuře aktivního místa byly zjištěny na úrovni interakcí mezi hemovou prostheticou skupinou, resp. jejími postranními řetězci, a apoproteinem. Individuální cytochromy P-450 se liší v orientaci a konformaci těchto řetězců. Tyto zdánlivě malé rozdíly mohou ovlivnit konformaci aktivního místa různých cytochromů P-450 a mohou tak spolurozhodovat o vlastnostech aktivního místa a o funkci těchto enzymů.

*Autoři děkují Grantové agentuře ČR za podporu grantového projektu č. 203/1999/277.*

### 03 STUDIUM METABOLISMU NITROANISOLŮ JAKO POTENCIÁLNÍCH FOTOAFINITNÍCH SOND PRO ZNAČENÍ AKTIVNÍHO CENTRA CYTOCHROMU P450

TOMÁŠ FRONĚK<sup>a</sup>, PETR HODEK<sup>a</sup>, JAROSLAV MRÁZ<sup>b</sup>, LUCIE BOŘEK-DOHALSKÁ<sup>a</sup> a MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, <sup>b</sup>Státní zdravotní ústav, Centrum hygieny práce, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Předkládaná práce je zaměřena na studium metabolismu 2-nitroanisolu (2NA) a jeho fluorovaných derivátů, 2-fluoro-4-nitroanisolu (2FNA) a 4-fluoro-2-nitroanisolu (4FNA) mikrosomálními cytochromy P450 (CYP). Studium metabolismu uvedených sloučenin cytochromy P450 má zásadní význam jak pro poznání mechanismu kancerogenního účinku 2NA (cit. <sup>1</sup>), tak vzhledem k potenciálnímu využití studovaných sloučenin jako sond pro fotoafinitní značení<sup>2</sup> aktivního centra CYP.

Studie byly prováděny na dvou modelových organismech – králíka a potkana. Pro metabolické experimenty byly použity mikrosomy izolované z jater zvířat premedikovaných β-naf-toflavonem, β-NF, (induktor CYP1A), acetonem a ethanolem (induktory CYP2E1), fenobarbitalem, PB, (induktor CYP2B), rifampicinem, RIF, (induktor CYP3A) a mikrosomy neindukovaných zvířat (s majoritním podílem CYP2C). V těchto systémech byl sledován *O*-demethylační metabolismus studovaných nitroanisolů. Nejeftektivněji byly metabolizovány 2NA a jeho fluorované deriváty cytochromy P450 obsaženými v mikrosomech neindukovaných zvířat a zvířat indukovaných PB. Navíc, při metabolismu 2FNA a 4FNA se významně uplatňují i mikrosomální CYP2E1. Mikrosomální frakce izolované z jaterní tkáně experimentálních zvířat indukovaných β-NF a RIF sledované sloučeniny neoxidovaly.

Zjištěné výsledky byly potvrzeny inhibičními experimenty. Specifické inhibitory CYP2B (3-isopropenyl-3-methyladamantan a 2-isopropenyl-2-methyl-adamantan)<sup>3</sup> efektivně inhibovaly *O*-demethylaci testovaných látek (IC<sub>50</sub> 10–100 μM). Obdobně efektivně inhiboval metabolismus sledovaných nitroanisolů selektivní inhibitor CYP2C, sulfafenazol. Při experimentech, kdy byla naopak testována schopnost nitroanisolů ovlivnit metabolismus specifických substrátů jednotlivých izoform CYP, byly výsledky *O*-demethylačních studií potvrzeny. Testované sloučeniny inhibovaly dealkylaci pentoxyresorfinu jako selektivního substrátu CYP2B, dále pak přeměnu specifického substrátu CYP2E1, chlorzoxazonu. Naopak na oxidaci specifických substrátů CYP1A (ethoxyresorufin) a CYP3A (testosteron) neměly vliv. Kromě toho, že se podařilo identifikovat cytochromy P450, které nitroanisoly efektivně oxidují u obou živočišných druhů, otevírá se možnost použít fotolabilních nitroanisolů jako fotoafinitních sond pro studium struktury jejich aktivních center.

Další experimentální práce byly proto zaměřeny na testování fotochemických vlastností uvedených nitroanisolů. V pokusech sledujících produkty aromatické nukleofilní fotosub-

stituce 2FNA, 4FNA a 2NA po expozici UV zářením bylo zjištěno, že nejvhodnější sondou je 2FNA. Při krátkodobé expozici (60 s) UV zářením je daná sloučenina (v prostředí methanolu) totálně přeměněna na fotosubstituční produkt, který byl hmotnostní spektrometrií identifikován jako 1,2-dimethoxy-4-nitrobenzen. Dvě další testované nitroanisoly nevykazovaly v tomto ohledu vhodné vlastnosti.

Využití 2FNA jako fotoafinitní sondy pro modifikaci aktivního centra CYP2B, CYP2C a CYP2E, s cílem identifikovat aminokyseliny katalytické domény těchto enzymů, bude předmětem dalších studií.

*Autoři děkují za podporu grantům GA ČR 203/99/1003, GA UK 246/1999 a MŠMT ČR VS96141.*

#### LITERATURA

1. Stiborová M., Schmeiser H. H., Frei E.: Collect. Czech Chem. Commun. 63, 857 (1998).
2. Singh A., Thornton E. R., Westheimer F. M.: J. Biol. Chem. 237, 3006 (1962).
3. Bořek-Dohalská L., Hodek P., Stiborová M.: Collect. Czech Chem. Commun. 65, 122 (2000).

#### 04 OXIDACE KARCINOGENNÍHO 2-NITROANISOLU A 2-ANISIDINU CYTOCHROMY P450 A PEROXIDASAMI

MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>, MARKÉTA MIKŠANOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ FRONĚK<sup>a</sup>, DENISA BALKOVÁ<sup>a</sup> a VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, <sup>b</sup>Mikrobiologický ústav, AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

V komplexní studii hledáme vysvětlení mechanismu karcinogenity 2-nitroanisolu a 2-anisidinu jako karcinogenů s dosud nevyjasněnými principy účinku. Prvním krokem k vysvětlení karcinogenního účinku obou sloučenin je poznání enzymů, kterými jsou metabolizovány (aktivovány a detoxikovány). 2-Nitroanisol a 2-anisidin jsou silnými karcinogeny, vyvolávají tvorbou nádorů močového měchýře u krys a myší<sup>1</sup>. Paradoxně k této skutečnosti jsou jen slabě genotoxické v testech *in vitro* a dokonce téměř úplně postrádají genotoxicitu ve všech běžně používaných testech *in vivo*<sup>2</sup>. Zjistili jsme, že metabolismus studovaných karcinogenů je zprostředkován hydroxylačními reakcemi katalysovanými cytochromy P450 a v močovém měchýři i jedoelektronovými oxidacemi katalyzovanými peroxidasami, jež jsou v močovém měchýři bohatě zastoupeny.

Nejefektivněji oxidačně demethylují oba karcinogeny cytochromy P450 přítomné v mikrosomech experimentálních zvířat (potkan, králík) neindukovaných (především CYP2C) a zvířat indukovaných fenobarbitalem (CYP2B1/2/4). 2-Nitroanisol je oxidován prostřednictvím cytochromů P450 na produkt shodný s oxidačním produktem *O*-demethylačního metabolitu 2-nitrofenolu. 2-Anisidin je cytochromy P450 metabolizován na tři majoritní produkty, jejichž struktura nebyla dosud určena.

2-Anisidin je metabolizován jedoelektronovou oxidací radikálovým mechanismem peroxidasami: laktoperoxidasou (LP), křenovou peroxidasou (HRP) a prostaglandin H syntetázou (PHS), přítomnou v mikrosomech beraních semenných vajíčků. Kinetické studie oxidace uvedeného karcinogenu peroxidasami prokázaly, že dvousubstrátová reakce probíhá ping-pongovým mechanismem. Novým výsledkem je identifikace produktů oxidace 2-anisidinu peroxidasami. Pomocí MS-MS spektrometrie bylo poprvé přímo zjištěno, že primárně tvořený radikál 2-anisidinu poskytuje čtyři majoritní barevné produkty diimin, chinonimin, azodimer a sloučeninu obsahující tři benzenové kruhy, jejíž přesná struktura dosud nebyla určena. Výsledky přinášejí i první odpovědi na otázku mechanismu karcinogenního působení 2-anisidinu. Charakter produktů oxidace sledovaného karcinogenu peroxidasami napovídá, že může působit jako karcinogen genotoxický. Jak radikály, tak diimin a chinonimin jsou elektrofilními sloučeninami, jež jsou schopné interagovat s makromolekulárními nukleofily, které jsou přítomné v organismu. Právě radikály a sekundární produkty diimin a chinonimin mohou být zodpovědné za iniciační (u radikálů ev. i promoční) fázi procesů kancerogeneze vyvolané 2-anisidinem. Pilotní studie využívající metody <sup>32</sup>P-postlabellingu signalizují, že reaktivní formou tohoto karcinogenu interagující s nukleofily (DNA, deoxyribonukleotidy) je diimin.

*Autoři děkují za podporu MŠMT ČR (VS96141) a GA ČR (203/99/1003 a 203/99/1628).*

#### LITERATURA

1. Anonym: Bioassay of o-Anisidine Hydrochloride for Possible Carcinogenicity, No. 89, Technical Report. U.S. National Cancer Institute, Bethesda 1978.
2. Thompson D. C., Eling T. E.: Chem. Res. Toxicol. 4, 474 (1991).

#### 05 $\alpha$ -NAFTOFLAVON JAKO AKTIVÁTOR A REVERZIBILNÍ I IREVERZIBILNÍ INHIBITOR CYTOCHROMU P450 3A6

LUCIE BOŘEK-DOHALSKÁ, PETR HODEK a MARIE STIBOROVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Poznání regulace aktivity cytochromů P450 (CYP) chemickými sloučeninami je, vzhledem k potenciálnímu využití pro modulaci účinku jak léčiv, tak i protokoxikantů a prokarcinogenů, cílem mnoha studií. Mezi lidské cytochromy P450, které jsou z tohoto hlediska studovány obzvlášť detailně, patří enzymy podrodiny CYP3A (CYP3A4/5). Je tomu tak proto, že se tyto enzymy podílí na metabolismu většiny léčiv<sup>1</sup>. Charakteristickým rysem enzymů podrodiny CYP3A je přítomnost nejen jejich inhibice selektivními inhibitory, ale i možnost zvýšení jejich aktivity specifickými aktivátory.

$\alpha$ -Naftoflavon ( $\alpha$ -NF) je jedním z dobře prozkoumaných substrátů CYP, který je používán i jako inhibitor CYP1A1/2. Tato sloučenina však působí také jako specifický efektor



lidského CYP3A4 a králíčího CYP3A6. Oxidaci některých substrátů CYP3A potence (stimuluje), a naopak metabolismus jiných inhibuje<sup>2</sup>. Mechanismus modulace aktivit CYP3A však dosud není osvětlen. Předpokládá se vazba  $\alpha$ -NF jak do aktivního centra enzymu, tak i do místa allosterického, vzdáleného od reakční domény enzymu<sup>2,3</sup>. Předkládaná práce je proto zaměřena na studium mechanismu modulace katalýzy oxidace pěti rozdílných substrátů CYP3A6 tímto efektem ( $\alpha$ -NF). Antibiotikum erytromycin a protinádorové léčivo tamoxifen byly vybrány jako exogenní substráty CYP3A6 a hormony estradiol, progesteron a testosteron pak jako substráty endogenní. Jaterní mikrosomy králíka premedikovaného rifampicinem (RIF) jako induktorem CYP3A6 byly použity jako subcelulární systém obsahující CYP3A6.

Oxidace estradiolu CYP3A6 byla studovaným efektem stimulována. Tento výsledek je v souladu s poznatky publikovanými pro CYP3A4 (cit.<sup>3</sup>) ukazující aktivační vliv  $\alpha$ -NF na metabolismus tohoto hormonu. Ostatní sledované substráty jsou naopak  $\alpha$ -NF inhibovány. Kinetické studie prokázaly, že  $\alpha$ -NF je reverzibilním inhibítozem oxidační demethylace erytromycinu katalyzované CYP3A6, s hodnotou  $IC_{50}$  107  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Oxidační *N*-demethylace tamoxifenu, zabráňující jeho hromadění v lidském organismu, je  $\alpha$ -NF rovněž reverzibilně inhibována. Hodnota  $IC_{50}$  pro  $\alpha$ -NF je u tohoto substrátu rovna koncentraci 8  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Oproti reverzibilní inhibici, kterou  $\alpha$ -NF vykazuje vůči oběma výše uvedeným substrátům, působí jako ireverzibilní inhibitor CYP3A6 v případě katalýzy oxidace endogenních substrátů progesteronu a testosteronu. Z kinetických studií je patrné, že dochází k inhibici 6 $\beta$ -hydroxylace progesteronu katalyzované CYP3A6, která je potencována časově závislou preinkubací enzymu s  $\alpha$ -NF za přítomnosti koenzymu NADPH. Studovaný efektor tedy v tomto případě CYP3A6 ireverzibilně inaktivuje. Podobné výsledky byly zjištěny i pro další substrát testosteron (jeho 6 $\beta$ -hydroxylaci). Inaktivace CYP3A6 vykazuje kinetiku reakce prvního řádu a je závislá jak na koncentraci inhibitoru,  $\alpha$ -NF, tak na přítomnosti koenzymu, NADPH. Maximální rychlostní konstanta inaktivace CYP3A6 je rovna  $7,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  pro progesteron a  $5,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  pro testosteron jako substráty. Koncentrace způsobující 50 % maximální inaktivace (zdánlivé konstanty inaktivace,  $K_I$ ) dosahují řádově hodnot  $10^{-5} \text{ mmol.l}^{-1}$ .

Získané výsledky signalizují jak reverzibilní vazbu  $\alpha$ -NF na proteinovou molekulu CYP3A6 vedoucí ke kompetici tohoto efektoru o vazbu s jiným substrátem (erytromycin, tamoxifen), tak i ireverzibilní inaktivaci CYP3A6. Inaktivace je pravděpodobně způsobena reaktivními metabolity  $\alpha$ -NF tvořenými za účasti NADPH vázajícími se na místo proteinu enzymu, které je esenciální pro vazbu progesteronu a testosteronu. V další fázi výzkumu předpokládáme určení cílových aminokyselin vazby metabolitů  $\alpha$ -NF, která vede k uvedené inaktivaci selektivních aktivit CYP3A6.

Autoři děkují za podporu MŠMT ČR (grant VS96141) a GA ČR (granty 203/99/1003 a 203/99/1628).

#### LITERATURA

1. Rendic S., DiCarlo F. J.: Drug Metab. Rev. 29, 413 (1997).
2. Shou M., Grogan J., Mancewicz J. A., Krausz K. W., Gonzalez F. J., Gelboin H. V., Korzekwa K. R.: Biochemistry 33, 6450 (1994).

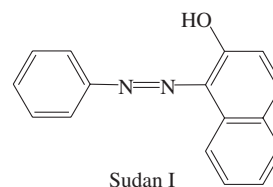
3. Ueng Y.-F., Kuwabara T., Chun Y.-J., Guengerich F. P.: Biochemistry 36, 370 (1997).

#### 06 KARCINOGENNÍ 1-FENYLAZO-2-HYDROXYNAFTALEN (SUDAN I, C.I. SOLVENT YELLOW 14) JE OXIDOVÁN LIDSKÝMI CYTOCHROMY P450 CYP1A1 A CYP1A2 *IN VITRO*

MARIE STIBOROVÁ a VÁCLAV MARTÍNEK

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Sudan I je karcinogenem vyvolávajícím nádory jater a močového měchýře. Tuto sloučeninu studujeme jako modelové karcinogenní azobarvivo, které neobsahuje amino skupiny ve své molekule. Sudan I je metabolizován mikrosomálními cytochromy P450 (CYP), které jej oxidují na C-hydroxy a C-dihydroxyderiváty nebo oxidačně štěpí na benzendiazoniový ion (BDI) (cit.<sup>1</sup>). Právě BDI je reaktivním intermediátem studovaného karcinogenu, který se kovalentně váže na nukleové kyseliny. Již v našich předchozích pracích byla identifikována struktura majoritního aduktu tvořeného v DNA z BDI. Jedná se o 8-(fenylazo)guanin<sup>2</sup>.



V předkládaném příspěvku identifikujeme, které cytochromy P450 Sudan I oxidují. K indukci CYP1A1/2, 2B1/2 a 2E1 v mikrosomech potkana jsme použili  $\beta$ -naftoflavon ( $\beta$ -NF), fenobarbital (PB) a etanol. Neefektivněji Sudan I oxidují CYP1A1/2  $\beta$ -NF mikrosomů (82% oxidovaného Sudanu I), méně pak CYP2B1/2 PB mikrosomů a enzymy etanolových mikrosomů či mikrosomů neindukovaných zvířat (všechny – 15 % oxidovaného Sudanu I). Přitom oxidace Sudanu I  $\beta$ -NF mikrosomy je efektivně inhibována inhibítozem CYP1A1/2  $\alpha$ -NF, zatímco inhibítozem CYP1A2 furafylinem prakticky ovlivněna není. Uvedené výsledky signalizují, že CYP1A1 je neefektivnějším cytochromem P450 oxidujícím Sudan I v mikrosomech.

Oxidace Sudanu I prostřednictvím CYP1A1 byla potvrzena použitím potkaního rekombinantního enzymu (CYP1A1) rekonstituovaného s NADPH:CYP reduktasou, který oxiduje Sudan I velmi efektivně. Studovaný karcinogen je rovněž oxidován v rekonstituovaném systému obsahujícím lidský rekombinantní CYP1A2, ale účinnost oxidace je asi dvacetiprocentní oproti CYP1A1. Lidský CYP3A4, králíčí CYP2B4 a CYP3A6 v rekonstitučních experimentech Sudan I neoxidují.

Vzhledem k tomu, že cytochromy P450 experimentálních zvířat nemusí být vždy vhodným modelem simulujícím katalytické vlastnosti lidských enzymů, bylo třeba výsledky potvrdit také experimenty s enzymem lidským. Proto byly pro



studium oxidace Sudanu I použity mikrosomy obsahující lidské rekombinantní cytochromy P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4), tzv. Supersomes<sup>TM</sup>. Sudan I je i v tomto systému neúčinněji přeměňován lidským CYP1A1. Oproti tomu je oxidace Sudanu I lidskými CYP1B1, CYP1A2, CYP2D6 a CYP3A4 výrazně slabší. U dalších testovaných cytochromů P450 již nebyla přeměna Sudanu I zjištěna. K charakterizaci oxidace Sudanu I cytochromem CYP1A1 bylo rovněž použito kinetických studií.

V předkládané práci prokazujeme, že lidský CYP1A1 je nejefektivnějším cytochromem P450 oxidujícím karcinogenní azobarvivo Sudan I. Výsledky jsou diskutovány z hlediska potenciálního rizika vystavení lidské populace studovanému karcinogenu.

*Autoři děkují za podporu MŠMT ČR (grant VS96141) a GA ČR (granty 203/99/1003 a 203/99/1628).*

#### LITERATURA

1. Stiborová M., Asfaw B., Anzenbacher P., Lešetický L.: *Cancer Lett.* 40, 319 (1988).
2. Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 489 (1995).

#### 07 IDENTIFICATION OF HUMAN ENZYMES ACTIVATING CARCINOGENIC ARISTOLOCHIC ACIDS: EVIDENCE FOR REDUCTIVE ACTIVATION BY CYP1A1 AND CYP1A2

MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>, EVA FREI<sup>b</sup>,  
MANFRED WIESSLER<sup>b</sup>, and HEINZ H. SCHMEISER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, Czech Republic,*

<sup>b</sup>*Department 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) and urothelial carcinomas in young Belgian women who had followed a slimming regimen including Chinese herbs. We identified the AA-DNA adducts in kidneys and in a ureter obtained after renal transplantation. One major DNA adduct of AA, 7-(deoxyadenosin-*N*<sup>6</sup>-yl)-aristolactam I and two minor adducts, 7-(deoxyguanosin-*N*<sup>2</sup>-yl)-aristolactam I and 7-(deoxyadenosin-*N*<sup>6</sup>-yl)-aristolactam II were detected. According to the structures of the DNA adducts identified, nitroreduction is the crucial pathway in the metabolic activation of AA. Interestingly, to date only 2–3 % of thousands of patients following the identical slimming treatment were affected. Taking into account that AA is a toxic product to the described extent should it not have involved more persons? Among possible causes of the different responses of individual patients, a difference in the pattern and activities of the enzymes catalyzing biotransformation of AA in individual patients can be the reason. Many

of genes for the enzymes metabolizing carcinogens are known to exist in variant forms or polymorphisms that have differing activities. These genetic variations appear to be important determinants of cancer risk. Therefore, determining the capability of CHN patients to metabolize AA and understanding, which human enzymes are involved in AA activation and/or detoxication is crucial in the assessment of individual susceptibility of women following slimming regimen to the development of CHN due to this natural carcinogen.

We compared the ability of human, minipig and rat hepatic microsomal samples to activate AA. Incubations with rat hepatic microsomes generated AA-DNA adduct profiles reproducing profiles in target tissue in rats. Identical patterns of AA-DNA adducts were also found using human and minipig hepatic microsomes. NADPH:CYP reductase and even cytochrome P450 (CYP) enzymes present in microsomes are the major candidates for the AA activation. In order to resolve which microsomal enzymes are responsible for activation of AAs (AA-DNA adduct formation), five experimental approaches were employed: *i*) induction of NADPH:CYP reductase and specific CYPs, *ii*) correlation of the AA-activation efficiencies under consideration with known marker activities of NADPH:CYP reductase and individual CYPs, *iii*) selective enzyme inhibition, *iv*) purification of enzymes (NADPH:CYP reductase and CYPs) and reconstitution, and *v*) heterologous expression systems (utilization of microsomes of Baculovirus infected insect cells containing recombinantly expressed human enzymes). The nuclease P1-enhanced version of the <sup>32</sup>P-postlabelling assay was used for the detection and the quantitation of adducts.

Inducer of CYP1A1/2 enzymes, β-naphthoflavone, significantly stimulated the production of AA-DNA adducts. On the other hand, inducers of CYP2B1/2 and CYP2E1 had no such effect. Likewise, a highly significant correlation was found between ethoxyresorufin *O*-deethylation, a marker for CYP1A1/2 and the formation of AA-DNA adducts. Only inhibitors of CYP1A (α-naphthoflavone, furafylline) significantly decreased the amount of the adducts formed by microsomes. The inhibitor of NADPH:CYP450 reductase (α-lipoic acid) inhibited the adducts formation, too, but in a lower extent. The results suggest a role of NADPH:CYP reductase and mainly CYP1A1/2 enzymes in AA-DNA adduct formation in microsomal systems. Using the purified enzymes (recombinant CYP1A1/2 and NADPH:CYP450 reductase) and microsomes of Baculovirus infected insect cells containing recombinantly expressed human CYP1A1/2 (Supersomes<sup>TM</sup>), the participation of these enzymes in the AA-DNA adducts formation was confirmed.

These results, the first report on activation of natural carcinogen AA by human enzymes, clearly demonstrate the role of specific human CYP enzymes (CYP1A1/2) in catalyzing AA reductive activation pathways. In the next phase of our work, CHN patients will be screened for genetic variations in genes of polymorphic Ah receptor modulating the expression of both CYP1A1 and CYP1A2 and those of polymorphic CYP1A1 in order to find possible relationships between genotypes and nephropathy, the level of AA-DNA adducts and urothelial cancer risk.

*Supported by GA CR (303/99/0893), Ministry of Education of CR (VS96141) and DKFZ.*

**08 SROVNÁNÍ OBSAHU A AKTIVITY  
CYTOCHROMU P450 A PEROXIDASY  
V MIKROSOMÁLNÍCH A CYTOSOLÁRNÍCH  
FRAKČÍCH CIBULEK TULIPÁNU (*TULIPA  
FOSTERIANA* L.), KULTIVARŮ RED EMPEROR  
A STRESSA**

MIROSLAV ŠULC, PETR HODEK  
a MARIE STIBOROVÁ

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra  
biochemie, Albertov 2030, 12840, Praha 2*

V komplexní studii sledujeme úlohu cytochromů P450 a peroxidasy v metabolismu cizorodých látek v rostlinách. V předkládaném příspěvku porovnááme základní charakteristiky subcelulárních systémů izolovaných ze dvou kultivarů modelové rostliny *Tulipa fosteriana* L. Mikrosomy izolované z cibulek tulipánů kultivarů Red Emperor a Stressa byly testovány z hlediska obsahu cytochromu P450, proteinu a aktivity NADPH: cytochrom P450 reduktasy a peroxidasy v závislosti na indukčních faktorech. Vedle mikrosomů byly charakterizovány i další subcelulární systémy, rostlinné cytosoly. Jako indukčních faktorů bylo použito ethanolu (induktor živočišného cytochromu P450 2E1), atrazinu a inkubace řezů cibulek tulipánů ve vodném prostředí za aerobních a anaerobních podmínek.

Mikrosomy izolované z cibulí tulipánů<sup>1</sup> obou kultivarů obsahují nejen cytochromy P450 (podobně jako mikrosomy živočišné), ale i peroxidasy oxidující známý substrát těchto enzymů, guajakol. Koncentrace cytochromu P450 (cit.<sup>2</sup>) i aktivity NADPH: cytochrom P450 reduktasy<sup>3</sup> jsou v mikrosomech obou kultivarů srovnatelné (0,83  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 0,76  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytochromu P450 pro Red Emperor a Stressa). Obsah cytochromu P450 je však zvyšován indukčními faktory pouze u kultivaru Red Emperor (inkubací řezů cibulek tulipánů za aerobních podmínek došlo k 30 % nárůstu specifického obsahu cytochromu P450). Obsah NADPH: cytochrom P450 reduktasy na indukční faktory reaguje také pouze u kultivaru Red Emperor (indukce specifické aktivity o 25 % inkubací řezů cibulek tulipánů za aerobních podmínek). Aktivita peroxidasy<sup>4</sup> v mikrosomech kultivaru Stressa se prakticky nemění, zatímco v cytosolu jsou výrazné změny. U kultivaru Red Emperor je tomu naopak. Zatímco u cytochromu P450 je známo, že je inducibilním enzymem, informace o indukci peroxidasy chybí. Indukční faktory užití v naší studii rozhodně nezvyšovaly obsah peroxidasy u obou kultivarů. Naopak se aktivita těchto enzymů snižovala.

Mikrosomy obou kultivarů oxidují látky, které jsou pro rostliny xenobiotiky. Konkrétně karcinogenní *N*-nitrosaminy, *N*-nitroso-*N*-methylanilin (NMA) a *N*-nitrosodimethylamin (NDMA), *N*-demethylační reakcí. Zatímco mikrosomální enzymy kultivaru Red Emperor oxidují obě sloučeniny, enzymy kultivaru Stressa jsou aktivní pouze v oxidaci NDMA.

Cytosolární frakce obou kultivarů také oxidují oba substráty (NMA, NDMA) v přítomnosti peroxidu vodíku.

Hodnoty  $K_m$  a  $V_{max}$  obou substrátů (NMA, NDMA) naznačují změny v mikrosomální i cytosolární frakci během indukce, ale i ve srovnání obou kultivarů.

*Autoři děkují za podporu MŠMT ČR (grant VS96141) a GA ČR (grant 203/99/1628).*

LITERATURA

1. Hansíková H., Frei E., Anzenbacher P., Stiborová M.: *Gen. Physiol. Biophys.* 13, 149 (1994).
2. Omura T., Sato R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964).
3. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster I., Bergstrand A.: *J. Cell. Biol.* 32, 415 (1967).
4. Putter J.: *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmeyer H. U., ed), str. 725 (1974).

**09 THE EFFECT OF PENTOXIFYLLINE  
ON P-GLYCOPROTEIN MEDIATED MULTIDRUG  
RESISTANCE OF L1210/VCR CELLS**

ZUZANA DROBNÁ<sup>a</sup>, MIROSLAV BARANČÍK<sup>a</sup>,  
and ALBERT BREIER<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute for Heart Research, SAS, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava,* <sup>b</sup>*Institute of Molecular Physiology and Genetics, SAS, Vlárská 5, 833 34 Bratislava, Slovak Republic*

The multidrug resistant (MDR) L1210/VCR cell line was obtained by long-term adaptation of L1210 mouse leukemic cell line on vincristine (VCR). This type of MDR was accompanied by an overexpression of P-glycoprotein (PGP)<sup>1</sup> that is responsible for the ATP-dependent efflux of drugs through the plasma membrane. Inhibition of the PGP with reversal agents, called as chemosensitizers, may "trap" the cytotoxic drug inside the cell; thus cellular drug resistance is reversed. Chemosensitizers represent a wide spectrum of the drugs with different chemical structure and distinct primary pharmacological action. The precise mechanism by which these agents modulate MDR was not resolved yet. They may depress MDR directly by inactivation of PGP-mediated drug efflux, or by affecting the membrane fluidity, as well as by primary influence on cell cation homeostasis, which in turn may regulate the transport properties of PGP.

In our previous studies was found that from tested methylxanthine derivatives (pentoxifylline, caffeine, theophylline and 1-methyl-3-isobutylxanthine) only pentoxifylline (PTX) was able to depress the resistance of mouse leukemic cell line L1210/VCR to vincristine<sup>2,3</sup>. L1210/VCR cell line exhibited the higher sensibility to PTX ( $IC_{50}$  for PTX ~ 400  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) in comparison to sensitive cell line ( $IC_{50}$  for PTX ~ 520  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). This phenomena is known as a collateral sensitivity. Resistant and sensitive cell lines did not exert any ultrastructural changes or gradual extinction of the cells during 72 hours cultivation in the medium containing 100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  of PTX. Significant inhibition of cell proliferation of L1210/VCR cells ( $IC_{50}$  for PTX ~ 43  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), accompanied with massive ultrastructural damage was observed after cultivation of these cells in the medium containing both PTX and VCR (0.2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). PTX in dose dependent manner increased [<sup>3</sup>H]-vincristine accumulation in L1210/VCR cells. Good correlation between the accumulation of [<sup>3</sup>H]-vincristine and the number of surviving L1210/VCR cells was observed. This indicated that MDR reversal by PTX is probably caused by a depression of PGP-transport activity. To estimate an influence of PTX on PGP-transport activity in resistant subline a doxorubicin accumulation study was performed. Resistant L1210/VCR cell line

was treated 0–72 hours in the presence of PTX (100 mg.l<sup>-1</sup>). At the particular time (0–72 hours) PTX was removed and than the doxorubicin accumulation by the treated cells was performed. The maximum intracellular level of doxorubicin was reached after 24 hour. After this time the intracellular level of doxorubicin was slowly decreasing and after 72 hour it reached the level of control cells (cells untreated with PTX).

By RT-PCR also the effect of PTX on the *mdr1* mRNA levels in resistant cells was determined. It has been found that after exposure of L1210/VCR cells to PTX (100 mg.l<sup>-1</sup>) for 48 hours the *mdr1* mRNA levels decreased 2-fold in comparison to the control. After exposure of cells to PTX for 72 hours the level of *mdr1* mRNA returned to the control level. The latter finding indicates, that PTX may control the PGP-mediated MDR not only on the level of transport activity but also on the level of *mdr1*-gene transcription.

*This work was supported by Slovak Grant Agency for Science VEGA SR 2/7190/20.*

#### REFERENCES

1. Poleková L., Barančík M., Mrázová T., Pirker R., Wallner J., Sulová Z., Breier A.: *Neoplasma* 39, 73 (1992).
2. Breier A., Barančík M., Štefanková Z., Uhrík B., Tribulová N.: *Neoplasma* 41, 297 (1994).
3. Štefanková Z., Barančík M., Breier A.: *Neoplasma* 43, 11 (1996).

### 10 MULTIDRUG RESISTANCE OF NEOPLASTIC CELLS ASSOCIATED WITH OVEREXPRESSION OF P-GLYCOPROTEIN DEPENDS ON MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES

VIERA BOHÁČOVÁ<sup>a</sup>, JANKA KVAČKAJOVÁ<sup>b</sup>, MIROSLAV BARANČÍK<sup>b</sup>, and ALBERT BREIER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 34 Bratislava,* <sup>b</sup>*Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava, Slovak Republic*

Multidrug resistance (MDR) of neoplastic cells represents a specific type of resistance when neoplastic cells become resistant to the diverse groups of chemotherapeutic agents with unrelated chemical structure and mechanisms of pharmacological action (such as vinca alkaloids, anthracyclines, anticancer antibiotics). This type of cross-resistance is often associated with increased transport activity of P-glycoprotein, the specific integral protein of plasma membrane, (PGP). Increased expression of PGP at the mRNA and protein level was observed in MDR mouse leukemic cell line L1210/VCR (in comparison with parental sensitive cell line), which were used as an experimental model. PGP is a member of ABC transporter family (ATP-hydrolyzing efflux pump) and in neoplastic MDR cells is responsible for elimination of lipophilic cytotoxic substances from intracellular space of the cells through the plasma membrane. PGP molecule contains similar sequences with phosphorylation sites of some protein kinases. This fact indicate that phosphorylation of PGP may represent a significant mechanism involved in its drug transport activity<sup>1</sup>.

In the present study we investigated the importance of protein phosphorylation in regulation of PGP transport activity and for the development of MDR phenotype. We studied the relation between the expression and function of PGP and the expression of several mitogen-activated protein kinases (MAPKs). MAPKs represent family of at least three subfamilies of protein kinases (ERKs, SAPK/JNKs, p38-MAPK) that are differ in the mechanisms of their stimulation and substrate specificities.

The expression of MAPKs by protein level in sensitive and multidrug resistant cells was investigated by Western blot assay using specific antibody. The development of MDR in resistant cell line was associated with increased expression and activity of p38-MAPK in cytoplasm, and specially its phosphorylated form, and also enhanced phosphorylation of endogenous substrate for p38-MAPK (ATF 2). In experimental situation when vincristine was present in cultivation medium, an additional increase in the level of p38-MAPK in cytoplasm was observed<sup>2</sup>. We found significant influence of inhibitors (SB 203508: p38-MAPK; PD 098059, UO126: ERKs) of some protein kinase on the resistance of L1210/VCR cells. SB 203508 (specific inhibitor of p38-MAPK) reduced degree of resistance to vincristine and also the effect was accompanied with lowering of LC<sub>50</sub> value to vincristine. Both specific inhibitors of the ERK cascade (PD098059, UO126) also reduced resistance of L1210/VCR cells to vincristine and induced increased intracellular accumulation of vincristine.

These results indicate important role of some protein kinases, especially p38-MAPK and partially ERK, in the regulation of PGP-associated multidrug resistance.

*This work was supported by Slovak Grant Agency for Science VEGA SR 2/7190/20.*

#### REFERENCES

1. Barančík M., Štefanková Z., Breier A.: *Gen. Physiol. Biophys.* 14, 171 (1995).
2. Barančík M., Boháčová V., Zbyňovcová M., Breier A.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 45 (1999).

### 11 OVEREXPRESSION OF P-GLYCOPROTEIN IS ACCOMPANIED BY CHANGES IN BIOSYNTHESIS OF POLY- (AND/OR OLIGO-) SACCHARIDES

ZDENA SULOVÁ<sup>a</sup>, ANDREA MEDVEĎOVÁ<sup>a</sup>, BRANISLAV UHRÍK<sup>a</sup>, TIBOR LIPTAJ<sup>b</sup>, IMA DOVINOVÁ<sup>c</sup>, MIROSLAV BARANČÍK<sup>d</sup>, and ALBERT BREIER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlárská 5, 833 34 Bratislava,* <sup>b</sup>*Faculty of Chemistry, Slovak Technical University, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,* <sup>c</sup>*Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava,* <sup>d</sup>*Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 33 Bratislava, Slovak Republic*

Mouse leukemic L1210/VCR cells were obtained by adaptation of parental L1210 cells to vincristine. They exhibit



multidrug resistance (MDR) predominantly mediated by overexpression of P-glycoprotein<sup>1,2</sup> (PGP). P-glycoprotein is an ATP-dependent efflux pump (member of the family of ABC transporters) and drug efflux is recognized as a feature that is securing this type of MDR (Ref.<sup>3</sup>). To protect the cell, PGP has to transport cytotoxic drugs across plasma membrane against their concentration gradients using the energy from ATP in the same amounts as they enter the intracellular space via passive diffusion. Because the process of drug efflux will consume a large amount of energy, it is reasonable to expect that in cells under this situation the velocity of several anabolic pathways will be reduced. The aim of the present study was to test an assumption that overexpression of PGP is accompanied with the changes in formation of oligo- and polysaccharides.

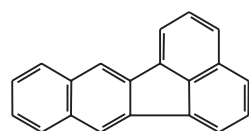
<sup>31</sup>P-NMR measurement of sensitive L1210 and resistant L1210/VCR cells (the latter in the presence of vincristine) revealed, that in resistant cells the level of UDP-glucose is remarkably decreased. Therefore, it is reasonable to expect that in resistant cells the biosynthesis of oligo- and/or polysaccharides be reduced. This assumption could be supported by histochemical staining of negative charged binding sites (mostly sialic acid) using polycationic dye ruthenium red<sup>4,5</sup>. While sensitive cells are coated by compact layer of sialic acid, in resistant cells cultivated in the absence or presence of vincristine and doxorubicine this layer is either reduced or absent. The glycogen content in resistant cells cultivated in the absence or presence of vincristine was decreased by about 50 % as compared with sensitive cells. Several alterations in the spectrum of glycoproteins (interacting with Concanavaline A activated sorbents) were observed when sensitive and resistant cells were compared.

All the above facts indicate that overexpression of PGP in L1210/VCR cells is accompanied by considerable depression of poly- and/or oligo-saccharides biosynthesis.

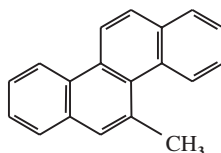
*This work was supported by VEGA SR 2/7190/20.*

## REFERENCES

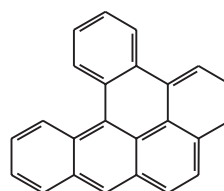
1. Barančík M., Boháčová V., Zbýňovcová M., Breier A.: Gen. Physiol. Biophys. 18, 45 (1999).
2. Boháčová V., Kvačkajová J., Barančík M., Drobná Z., Breier A.: Physiol. Res., in press.
3. Vendrik C. J. P., Bergers J. J., De Jong W. H., Steerenberg P. A.: Cancer Chemother. Pharmacol. 29, 413, (1992).
4. Luft J. H.: Anat. Rec. 171, 347 (1971).
5. Luft J. H.: Anat. Rec. 171, 369 (1971).



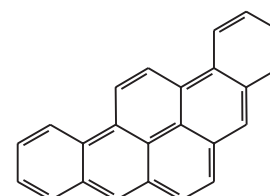
Benzo[k]fluoranthen



5-Methylchrysen



Dibenzo[a,l]pyren



Dibenzo[a,i]pyren

Obr. 1. Struktury některých mutagenních PAH vykazujících silnou dioxinovou toxicitu mediovanou přes Ah receptor

## 12 EPIGENETICKÉ MECHANISMY PŮSOBENÍ POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

MIROSLAV MACHALA<sup>a</sup>, LUDĚK BLÁHA<sup>a,b</sup>,  
JAN VONDRÁČEK<sup>a,c</sup>, KATEŘINA MINKSOVÁ<sup>c</sup>  
a JIŘINA HOFMANOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 621 32 Brno, <sup>b</sup>Přírodovědecká fakulta MU, 611 37 Brno, <sup>c</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, 612 35 Brno

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou významnou skupinou karcinogenů. Jako mechanismus jejich účinku je převážně sledována jejich mutagenita event. produkce aduktů s DNA. Procesy karcinogeneze ovšem zahrnují řadu epigenetických (negenotoxických) mechanismů. Společným důsledkem těchto mechanismů je modulace signální transdukce a změna exprese klíčových genů v buňce, porušení buněčné kinetiky (proliferace, diferenciacie a apoptózy), ztráta kontroly homeostase a klonální expanze transformovaných buněk. Epigenetické děje se tedy uplatňují především v promoční a progresivní fázi karcinogeneze<sup>1,2</sup>.

Různými systémy *in vitro* byly v posledních letech detekovány některé epigenetické efekty PAH: oxidativní stres, negativní nebo pozitivní modulace estrogenních odpovědí, vazba na „dioxinový“ Ah receptor a inhibice mezibuněčné komunikace („gap junctional intercellular communication“). Studie se téměř výhradně omezovaly na některé z 16 PAH, vybraných jako tzv. prioritní polutanty (patří mezi ně např. naftalen, pyren, benzo[a]anthracen, benzo[a]pyren, benzo[k]fluoranthen, dibenzo[a,h]anthracen). Zároveň s rozvojem analytických technik (GC/MS, HPLC) byly v životním prostředí identifikovány desítky dalších PAH, většinou s pěti- nebo šestičlennými kruhy<sup>3</sup>. U řady těchto PAH byla nalezena významná mutagenní aktivita *in vitro*; zvláště dibenzopyreny, cyklopenta[c,d]pyren, 5-methylchrysen (viz obr. 1) a některé další jsou velmi silnými mutageny<sup>3,4</sup>. Epigenetické efekty mutagenních PAH však dosud nejsou dostatečně stanoveny.

V našich laboratořích je zaváděna sada metod *in vitro* detekujících v modelových buněčných liniích nejvýznamnější epigenetické mechanismy xenobiotik. V této studii byly stanoveny potenciály indukce genové exprese, modulované Ah receptorem a estrogenním receptorem  $\alpha$ , a také parametry oxidativního stresu (produkce ROS, snížení koncentrace glutathionu, zvýšení koncentrace oxidovaných bazí DNA) po expozici mutagenními PAH *in vitro*. Modelovými buněčnými systémy byly H4IIE. GudLuc (hepatoma buněčná linie transfekovaná reportérovým genem pro luciferasu kontrolovaným Ah receptorem), buněčná linie MVLN (odvozena od buněk



lidského karcinomu prsu MCF-7 s luciferasou jako reportérovým genem, jehož exprese je kontrolována estrogenním receptorem), hepatoma buňky Hepa-1c1c, které byly využity pro stanovení vybraných parametrů oxidativního stresu. Toxické potenciály jednotlivých PAH byly kalkulovány vůči efektům referenčních látek (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu, 17 $\beta$ -estradiolu a menadionu).

Oxidativní stres v Hepa-1 buňkách po expozici PAH byl překvapivě významně nižší než efekt modelového xenobiotika menadionu. Estrogenní receptor byl signifikantně aktivován *in vitro* některými PAH nebo jejich metabolity. Celková estrogenita PAH však musí být hodnocena komplexně: PAH mohou působit také jako antiestrogeny zvýšením metabolismu estradiolu na méně aktivní nebo neaktivní metabolity a AhR agonisti vykazují antiestrogenitu vzájemným ovlivněním estrogenního receptoru aktivovaným AhR (cit.<sup>5</sup>). Jako nejvýznamnějším mechanismem působení se ukázala silná dioxinová (Ah receptor-mediovaná) aktivita řady PAH. AhR-mediovaná odpověď (dioxinová toxicita), estrogenita event. antiestrogenita ve svém důsledku znamenají endokrinní disrupci, rizikové zvýšení buněčné proliferace a další negenotoxické procesy. Chronická zátěž PAH tak představuje kromě účinků mutagenních významný příspěvek epigenetických mechanismů vedoucích ke karcinogenezi.

*Tato práce byla podporována grantem GA ČR č. 525/98/1266.*

#### LITERATURA

1. Yamasaki H., Ashby J., Bignami M., Jongen W., Linna-  
inmaa K., Newbold R. F., Nguen-Ba G., Parodi S., Rive-  
dal E., Schifmann D., Simons J. W. I. M., Vasseur P.:  
*Mutation Res.* 353, 47 (1996).
2. Trosko J. E., Chang C. C., Upham B. L., Wilson M. R.:  
*Toxicol. Lett.* 102, 71 (1998).
3. Durant J. L., Busby W. F., Lafleur A. L., Penman B. W.,  
Crespi C.: *Mutation Res.* 371, 123 (1996).
4. Durant J. L., Lafleur A. L., Busby W. F., Donhoffner L.  
L., Penman B. W., Crespi C. L.: *Mutation Res.* 446, 1 (1999).
5. Arcaro K. F., O'Keefe P. W., Yang Y., Clayton W.,  
Gierthy J. F.: *Toxicology* 133, 115 (1999).

### 13 DEVELOPMENT OF ENZYME IMMUNOASSAY FOR ORGANOCHLORINE PESTICIDES

BARBORA MIČKOVÁ<sup>a</sup>, LUDMILA KARASOVÁ<sup>a</sup>,  
LADISLAV FUKAL<sup>a</sup>, PAVEL RAUCH<sup>a</sup>,  
FABIANA FINI<sup>b</sup>, STEFANO GIROTTI<sup>b</sup>,  
ANTONIO ABAD<sup>c</sup>, J. J. MANCLUS<sup>c</sup>,  
J. V. MERCADER<sup>c</sup>, and ANGEL MONTOYA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic,* <sup>b</sup>*University of Bologna, Italy,* <sup>c</sup>*Laboratorio Integrado de Bioingeniería, Polytechnical University Valencia, Spain*

The main problem of food safety is its contamination with biologically active compounds like pesticides, hormones and drugs. Therefore, the monitoring of food samples is of great importance. Unfortunately, the nowadays methods, most often chromatography and electrophoresis, are very complicated

and include several cleaning steps before analysis. Simplifying and minimising the analysis are the key problems. The initial screening test methods should be technically simple, inexpensive and useful for the routine analysis of a large number of samples. These requirements should be met by enzyme immunoassay (ELISA) with photometric and/or chemiluminescent detection. The aim of this study was to develop indirect ELISA for pesticides from both DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and endosulfan families.

The goal of our work was to obtain high-affinity monoclonal antibodies (MAbs) to the main families of chlorinated insecticides, i.e. the DDT family and the chlorinated cyclodiene family. Since hapten design is a key step in the development of immunoassays for small molecules, the synthesis of several haptens with different spacer arms attached through different molecular sites, and their use to produce MAbs to both chlorinated insecticides families, was undertaken. MAbs were subsequently used as the primary immunoreagents to develop ELISAs as alternative to chromatographic techniques for the screening of large number of food and environmental samples.

Five haptens resembling as much as possible the general chemical structure of the DDT were synthesised. Similarly, four haptens resembling cyclodiene family were synthesised. All the haptens were covalently attached to BSA using modified active ester method hapten-to-protein molar ratios were estimated to be between 14 and 21. All the haptens were also covalently attached to ovalbumin using the mixed-anhydride method having molar ratios between 5 and 11. Female mice (BALB/c) were immunised with bovine serum albumin – hapten conjugates using standard procedure. Mouse spleen lymphocytes were fused with murine myeloma cells (P3-X63-Ag 8.653) at a 5:1 ratio using polyethylene glycol 1,500. Indirect format was used for ELISA. Plate was coated with ovalbumin-hapten conjugate. Then antibody and standard or sample were added and incubated for 2 hrs. Next, plate was incubated for 1 h with peroxidase-labelled rabbit anti-mouse immunoglobulins. Finally, peroxidase activity was determined either by standard *o*-phenyldiamine procedure, or by chemiluminescent assay by using several substrates, among them SuperSignal substrate (SS, Pierce) was the best.

Enzyme immunoassays (with peroxidase (HRP) and/or alkaline phosphatase (ALP) as a label) to DDT and endosulfan with photometric and luminescent detection were developed. Preferably HRP was used, because of simpler and more rapid detection. The advantages of luminescent assay in comparison with photometric detection are a wider working range for pesticide analysis and a lower consumption of immunoreagents. Because the organochlorine pesticides are poorly solubilized in water solutions, the effects of organic solvents and Tween 20 on immunoglobulins affinity have been also tested. Limited solubility of organochlorine pesticides resulted in adsorption effects on plastic materials (like tips, polystyrene microplates, etc). To avoid adsorption effects several experiments using Tween 20 and organic solvents were carried out. The best results were obtained with methanol in final concentration 10–20 %. These concentrations decrease adsorption to the minimum and have also minimum effect to nativity of immunoglobulins (no denaturation effects were observed). Developed immunoassay format using organochlorine pesticide solubilized in methanol is thus recommended for use.

Developed immunoassay formats have been used to analy-

Table I  
Determination of DDT family (mg.kg<sup>-1</sup>) by both GC-ECD and ELISA

Method	Standard	Soil (only DDE)	Lettuce	River fish fat
GC-ECD	3.36±0.14	1.06±0.05	1.17±0.09	4.50±0.22
GC recalculated <sup>a</sup>	3.96±0.15	1.06±0.05	0.64±0.05	5.54±0.24
ELISA	4.02±0.21	0.97±0.09	0.56±0.12	5.01±0.28

<sup>a</sup> Results recalculated with respect to cross reactivities of DDE and DDD derivatives

ze real samples. The main problem encountered in this area is to remove fat from analyzed sample. Organochlorine pesticides are solubilized preferable in hydrophobic compounds, i.e. mainly in fat. Fat is interfering compound for all analytical techniques, as well as for immunoassays. We tried to use first of all dilution of sample to be analyzed, as is typically used in immunoassays. In case of spiked milk samples to high extent is possible to use this methodology and distinguished milk samples contaminated over the detection limit. For meat samples, fat must be removed from analyzed samples, because it has fatal interfering effect. This was done by using gel chromatography.

Developed ELISAs were used to analyze samples of different origin, and the results were compared to those obtained by GC-ECD as reference method (Table I). Thus developed indirect ELISA with both photometric and chemiluminescent detection should be used as screening method for large number of food and environmental samples, or even alternative to chromatographic techniques.

*This work was supported by the European Commission grant: INCO Copernicus No. ERBIC15CT961001.*

#### 14 DLOUHODOBÝ VLIV NÍZKÝCH DÁVEK ORGANOFOSFOROVÉ SLOUČENINY SARINU NA VYBRANÉ HEMATOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ UKAZATELE PO JEDNORÁZOVÉ ČI OPAKOVANÉ INHALAČNÍ EXPOZICI POTKANA

JIRÍ KASSA<sup>a</sup>, MIROSLAV PECKA<sup>b</sup>, MILOŠ TICHÝ<sup>b</sup>, JIRÍ BAJGAR<sup>a</sup> a JOSEF VACHEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra toxikologie, <sup>b</sup>Katedra válečného vnitřního lékařství, Vojenská lékařská akademie JEP, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

Organofosforové sloučeniny patří mezi ireverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy, jejichž toxický účinek se projevuje především cestou narušení cholinergního přenosu nervového vzruchu<sup>1</sup>. Vedle cholinergních účinků však byla v případě akutní intoxikace těmito noxami popsána i celá řada nespecifických, necholinergních účinků, mezi něž patří i stresogenní účinek či ovlivnění některých hematologických ukazatelů<sup>2</sup>. Zatímco průběh akutní intoxikace vysokými dávkami OF sloučenin byl mnohokrát popsán, málo se ví o možných dlouhodobých účincích nízkých dávek těchto nox, jež samy o sobě nevyvolávají klinicky zjevnou hyperstimulaci choli-

nergního nervového systému. Tato studie sleduje dlouhodobý vliv vysoce toxické OF sloučeniny sarinu na vybrané hematologické a biochemické ukazatele včetně markerů stresu a aktivity cholinesteras za tři měsíce po jednorázové či opakované inhalační expozici potkanů nízkým dávkám sarinu.

Bílí potkani kmene Wistar byli exponováni OF sloučenině sarinu v inhalační komoře po dobu 60 minut. Sarin byl použit ve třech různých koncentracích – podprahové (0,8 µg.l<sup>-1</sup>) nevyvolávající ani klinické ani laboratorní příznaky otravy, prahové (1,25 µg.l<sup>-1</sup>) nevyvolávající klinické známky otravy při signifikantní inhibici erytrocytární AChE a nadprahové (2,5 µg.l<sup>-1</sup>) vyvolávající vedle statisticky významné inhibice erytrocytární AChE i mírné klinické známky intoxikace. Přitom prahová koncentrace sarinu byla použita jednorázově či opakovaně (tříkrát v průběhu jednoho týdne). Za tři měsíce po expozici byly potkani usmrceni dekapitací a byla jim odebrána krev a vybrané orgány ke stanovení základních hematologických ukazatelů s použitím automatického analyzátoru krevních částic, biochemických ukazatelů v séru s využitím komerčně dostupných setů, markerů stresu – hladiny kortikosteronu (KS) v plazmě fluorimetrickou metodou podle Mattingliho<sup>3</sup> a aktivity tyrozin aminotransferasy (TAT, EC 2.6.1.5) v játrech fluorimetrickou metodou podle Diamondstona<sup>4</sup>. Aktivita acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) byla stanovována v erytrocytech, bránici a mozku, aktivita butyrylcholinesterasy (BuChE, EC 3.1.1.8) v plazmě spektrofotometrickou metodou podle Ellmana<sup>5</sup>.

Jak základní hematologické vyšetření krve, týkající se především krevního obrazu včetně diferenciálního rozpočtu bílých krvinek, tak biochemické vyšetření séra zahrnující stanovení hladin proteinů a lipidů, glykémie, aktivity jaterních enzymů, hladiny minerálů, kyseliny močové, kreatininu a močoviny nevykázalo statisticky významné změny u sarinem exponovaných potkanů ve srovnání s kontrolními potkany, kteří byli v inhalační komoře exponováni tři měsíce před odběry čistému vzduchu. Podobně hodnoty aktivity AChE v erytrocytech, bránici a mozku stejně jako aktivity BuChE v plazmě nebyly u sarinem exponovaných potkanů statisticky významně odlišné od hodnot získaných od kontrolních potkanů (tab. I). Naproti tomu oba markery stresu vykazovaly u potkanů opakovaně exponovaných prahové dávce či jednorázově exponovaných nadprahové dávce sarinu statisticky významné zvýšení svých hodnot oproti hodnotám kontrolním v případě uvedení do celkové éterové narkózy před jejich usmrcením (tab. II).

Výše uvedené výsledky prokázaly, že v případě expozice organismu nízkým dávkám OF sloučeniny sarinu nedochází z laboratorního hlediska k narušení homeostasy vnitřního prostředí stejně jako k narušení cholinergního přenosu nervové-

Tabulka I

Aktivita cholinesteras v krvi a tkáních u kontrolních a sarinem exponovaných potkanů (3 měsíce po expozici), aktivita cholinesteras je uváděna v % kontrolních hodnot (průměr ± směrodatná odchylka souboru)

Koncentrace sarinu	Kontrolní	Podprahová	Prahová		Nadprahová
			jednorázově	opakovaně	
AChE v erytrocytech	100±9,8	97,4±9,8	98,9±9,8	103,7±9,8	103,6±9,8
BuChE v plazmě	100±12,2	109,6±12,2	110,8±12,2	95,0±12,2	93,1±12,2
AChE v bránici	100±8,0	112,9±8,0	105,5±8,0	114,0±8,0	108,4±8,0
AChE v mozku	100±7,1	101,0±7,1	103,4±7,1	100,4±7,1	100,8±7,1

Tabulka II

Vliv nízkých dávek sarinu na zvolené markery stresu (3 měsíce po expozici) (průměr ± směrodatná odchylka souboru)

Koncentrace sarinu	Kontrolní	Podprahová	Prahová		Nadprahová
			jednorázově	opakovaně	
KS v plazmě [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	52±7	47±7	52±7	51±7	64±7 <sup>a</sup>
TAT v játrech [ $\mu\text{kat.kg}^{-1}$ ]	35,1±6,3	42,3±6,3	45,5±6,3	49,6±6,3 <sup>a</sup>	57,8±6,3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> statistická významnost:  $p < 0,05$

ho vzruchu. Naproti tomu ještě tři měsíce po expozici nízkým dávkám sarinu vykazují pokusná zvířata zvýšenou citlivost ke stresu a to i v případě opakované expozice klinicky latentní dávkou sarinu, což může mít svůj klinický význam vzhledem k možným okolnostem expozice člověka těmto noxám (profesionální, náhodné či suicidální otravy OF insekticidy, otravy vysoce toxickými OF ve válečných podmínkách či v důsledku teroristického činu).

*Tato práce byla podpořena grantem MO 66020397202.*

#### LITERATURA

- Marrs T. C.: *Pharmacol. Therap.* 58, 51 (1993).
- Kassa J.: *Voj. zdrav. listy – Suppl.* 67(2), 15 (1998).
- Mattingly D.: *J. Clin. Pathol.* 15, 374 (1962).
- Diamondstone T. I.: *Anal. Biochem.* 16, 396 (1966).
- Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V. Jr., Featherstone R. M.: *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).

## 15 TOXINY ŽIVOČIŠNÝCH JEDŮ – MÁLO ZNÁMÁ SKUPINA XENOBIOTIK

JIRÍ PATOČKA a JOSEF FUSEK

*Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, Šimkova 878, 500 01 Hradec Králové*

Praktické zkušenosti lidí s živočišnými jedy sahají do dávné historie lidstva, ale teprve moderní chemické metody, umožňující separovat čisté látky z komplikovaných směsí a určit jejich chemickou strukturu ukázaly, jak zajímavé látky dokáže příroda připravit. Protože toxicita je jedním z významných projevů biologické aktivity chemické látky, jsou četné toxiny používány jako vědecké nástroje pro studium fyziolo-

gických dějů, jako léčiva v medicíně a mohou také sloužit jako modelové látky při navrhování syntéz nových sloučenin předpokládáných farmakologických vlastností<sup>1</sup>. Toxiny představují pro xenobiochemii nový a zatím málo využívaný zdroj informací.

Systematické studium živočišných toxinů je úzce spjato s rozvojem chemie a má zatím krátkou historii. Až dosud bylo prozkoumáno jen nepatrné množství těchto chemicky, biochemicky i farmakologicky velmi zajímavých látek, ale i to co o nich dosud víme, stojí za seznámení.

Toxiny jsou produkovány téměř všemi živočišnými druhy a hrají významnou úlohu v jejich životě. Produkce jedovatých látek se vyvinula v průběhu fylogenetického vývoje u mnoha druhů patřících k mnoha taxonům. Nacházíme je proto u mikroskopického zooplanktonu (bičikovci), u hmyzu (vosy, včely, mravenci), členovců (pavouci, štíři), korálnatců (mořské sasanky), měkkýšů (homolice), plazů (hadi) obojživelníků (žáby, mloci), ryb (čtyrzubci), i ptakořitných savců (ptakopysk). Slouží jim buď jako prostředek pro ochromení a usmrcení kořisti nebo jako účinná ochrana před predátory. Fanerotoxické organismy mají zvláštní jedový aparát, kterým vpravují jed do organismu jiného živočicha, u organismů kryptotoxických se tvoří a ukládají jedovaté látky ve tkáních a živočich se tak stává jedovatý pro jiného živočicha. Jed živočichů je vždy tvořen komplikovanou směsí řady látek a tato směs je mnohem účinnější než jednotlivé komponenty.

Po chemické stránce tvoří toxiny neobyčejně rozmanitou skupinu struktur. Můžeme mezi nimi nalézt jednoduché malé molekuly jako je kyselina mravenčí u mravenců rodu *Formica*, i velké a složité molekuly proteinů jako je např.  $\alpha$ -latrotoxin, hlavní toxický princip pavouka *Latrodectus mactans*, známého jako „černá vdova“ (cit.<sup>2</sup>). Nacházíme mezi nimi malé i velké peptidy<sup>3</sup>, lineární i cyklické, polyaminy a acylpolyaminy, četné dusíkaté heterocyklické látky typu alkaloidů<sup>4</sup>, makrocyclické a polycyclické ethery a řadu dalších pozoru-

hodných struktur. Také mechanizmy jejich toxického účinku jsou velmi rozdílné. Některé živočišné toxiny fungují jako inhibitory enzymů, jiné se váží na některé receptory či iontové kanály membrán nebo arteficiální iontové kanály v buněčných membránách samy vytvářejí, jiné zase narušují cytoskelet buněk a zasahují do jejich dělení. Většina živočišných toxinů vykazuje orgánovou selektivitu a mezi nejvýznamnější účinky patří jejich kardiotoxicita, neurotoxicita, hemotoxicita a nefrotoxicita. Moderní medicína objevila v toxinech řadu vynikajících léků a mnohé toxiny se staly vzorem pro syntézu nových léčiv, bez nichž by se již současná medicína neobešla<sup>5</sup>. Stále však známe jen nepatrný zlomek toho, co nám příroda v podobě toxinů nabízí, přestože výzkum je podporován řadou farmaceutických firem a v posledních letech je velmi intenzivní. Důkazem toho je i tato souhrnná práce, v níž je podán přehled o chemické struktuře nejvýznamnějších skupin živočišných toxinů, mechanismech jejich biologického účinku a nově vyvíjených léčivech, k jejichž syntéze byl dán podnět poté, co byla zjištěna chemická struktura toxinu a prozkoumány jeho farmakologické a toxikologické vlastností.

*Tato práce byla podpořena grantem MO ČR 66021299116.*

#### LITERATURA

1. Benigni R., Richard A. M.: *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 28, 7 (1998).
2. Saibil H. R.: *Nat. Struct. Biol.* 7, 1 (2000).
3. Patočka J., Strunecká A.: *ASA Newsletter* 99, 20 (1999).
4. Patočka J., Ardila M. C., Vázquez M. V.: *Chem. Listy* 94, 230 (2000).
5. Fusek J., Patočka J.: *Postgrad. Med.* 1, 58 (1999).

#### 16 PRIAMÝ MONITORING KVALITY IZOLOVANÝCH MITOCHONDRÍI VYUŽITÍM SYNCHRÓNNEHO FLUORESCENČNÉHO FINGERPRINTU

JAROSLAV KUŠNÍR, VLADIMÍRA TOMEČKOVÁ,  
KATARÍNA DUBAYOVÁ a JURAJ GUZY

*Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ,  
Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská republika*

Mitochondrie ako bunčné organely sú definovaným živým systémom. Tento systém má na jednej strane vlastnosti podobne vlastnostiam celých buniek, na strane druhej ide o živý systém zjednodušený, s obmedzeným počtom biochemických pochodov, ale aj s obmedzenou stabilitou. Tieto „obojaké“ vlastnosti mitochondrií a ich metodická dostupnosť spôsobujú, že sú dlhodobo predmetom záujmu, najmä pri štúdiu energetického metabolizmu, pri genetických štúdiách, pri skúmaní membránového transportu a iných základných pochodov.

Izolované mitochondrie *in vitro* z hľadiska biochemického majú relatívne vysokú funkčnú a štruktúrnú nestabilitu. Známa je citlivosť na mechanické vplyvy, na teplotu, prítomnosť látok porušujúcich biomembrány. Udržať funkčnosť mitochondrií viac ako 24 hodín po izolácii<sup>1</sup> je aj za ideálnych podmienok veľmi náročné.

Z uvedených dôvodov mitochondrie po izolácii sa podrobujú funkčnej skúške. Tá sa robí najčastejšie sledovaním spotreby kyslíka kyslíkovou elektrodou Clarkovho typu v stave 4 (bez prídavku ADP), v stave 3 (po prídavku ADP) za použitia sukcinátu ako substrátu. Podiel spotreby kyslíka v stave 3 a v stave 4 vyjadruje respiračný kontrolný pomer (RKP).

Zmena biologickej funkčnosti je prakticky vždy spojená s morfológickými zmenami. Morfológické štúdium mitochondrií pri každom biochemickom experimente je nepraktické. Preto sme sa pokúsili vypracovať metódu na nepriame štúdium celistvosti mitochondrií. Táto metóda je založená na meraní synchrónneho fluorescenčného spektra<sup>2</sup> a jeho špeciálnom počítačom spracovaní do podoby synchrónneho fluorescenčného fingerprintu (SFF)<sup>3</sup>.

Unikátnou vlastnosťou metódy je jej použitie v širokom rozmedzí veľkosti častíc od malých molekúl cez biopolyméry, až po bunčné organely. Jej podstatou je paralelné fluorescenčné a nefelometrické meranie a jeho trojrozmerné počítačové vyhodnotenie<sup>3</sup>. Metóda bola testovaná modelovým pokusom, pri ktorom sa merali SFF natívnych mitochondrií, mitochondrií podrobených regulovanému teplotnému pôsobeniu a mitochondrií po účinku dodecylsulfátu. Výsledky týchto meraní sa porovnávali s fluorescenčnými fingerprintami mitochondrií počas prirodzeného „starnutia“, tj. pri uchovávaní mitochondrií po dobu 24–72 hodín.

Záznamy synchrónnych fluorescenčných fingerprintov jednotlivých vzoriek mitochondrií priniesli charakteristické grafické vyjadrenia vlastností mitochondrií po účinku opísaných fyzikálnych a chemických vplyvov. Keďže tieto spektrá odrážajú najmä povrchové vlastnosti častíc – prítomnosť fluoroforov v biomembráne a jej molekulovú dynamiku, tento typ meraní môže nahradiť časovo náročné morfológické štúdiá a významne doplniť metódu RKP. Mitochondrie definované charakteristickým SFF majú spektrálny atest kvality a funkčnosti. Nezanedbateľnou výhodou sú aj minimálne množstvá mitochondrií potrebné na testovanie pomocou SFF – 20  $\mu$ l.

#### LITERATÚRA

1. Johnson D., Lardy H., v: *Methods in Enzymology*, str. 94. AP, New York 1997.
2. Rao M. Ch.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1351 (1991).
3. Kušník J., Dubayová K., Makuchová V.: *Chem. Papers* 52, 291 (1998).
4. Dubayová K., Kušník J., Makuchová V.: *Chem. Papers* 52, 797 (1998).

#### 17 STOBADÍN A MITOCHONDRIE SRDCA A PEČENE

JURAJ GUZY, EVA BARNOVÁ,  
MÁRIA MAREKOVÁ, ZENÓBIA CHAVKOVÁ  
a JAROSLAV KUŠNÍR

*Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ,  
Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská republika*

Účinok stobadínu ((-)-*cis*-2,8-dimetyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1*H*-pyrido[4,3*b*]indol) bol doteraz sledovaný hlavne



## Tabuľka I

Vplyv stobadínu na mitochondriálne parametre

	Srdce – skupina		Pečeň – skupina	
	kontrolná	pokusná	kontrolná	pokusná
Stav 4	17,6±0,5	13,6±0,6*	17,9±0,4	18,7±0,4
Stav 3	98,0±2,5	66,6±2,1*	33,5±0,7	33,4±0,7
ATP-áza	0,828±0,010	0,948±0,020*	0,154±0,009	0,162±0,005
SOD	2,290±0,083	2,290±0,079	0,271±0,050	0,078±0,030*

na úrovni metabolizmu nervového tkaniva<sup>1</sup>, napriek tomu, že táto látka bola syntetizovaná ako kardioprotektívna zlúčenina. V našej práci sme kardioprotektívny účinok potvrdili na modeli pokusu s králikmi. Pokusným zvieratám sme aplikovali preventívne stobadín a následne sme vyvolali mikroinfarkty izoproterenolom. Sledovali sme aktivity enzýmov krvného séra (AST, LDH, CK) po izoproterenole a po preventívnom podaní stobadínu. Zaznamenali sme výrazný protektívny účinok na ich aktivitu<sup>2</sup>.

Na základe týchto výsledkov sme sa pokúsili vysvetliť mechanizmus protektívneho účinku stobadínu v pokusoch po *in vitro* aplikácii tejto látky.

Srdcové mitochondrie sme izolovali z králikov podľa Mela a Seitz<sup>3</sup>, pečevé mitochondrie podľa Johnsona a Lardyho<sup>4</sup>. V práci boli sledované nasledovné parametre: spotreba O<sub>2</sub> v stave 4 (bez prídavku ADP), v stave 3 (po prídavku ADP) za použitia sukcinátu ako substrátu. Výsledky udávame v mmol O<sub>2</sub>/min.kg mitochondriálnej bielkoviny. Ďalej ATP-ázovú aktivitu podľa Meissnera a spol.<sup>5</sup> v jednotkách mol P<sub>i</sub>/min.kg<sup>6</sup> a aktivitu superoxididmutázy (SOD) podľa Shaperovej a spol.<sup>6</sup> ako aktivita 10<sup>4</sup>/g<sub>p</sub>. Bielkoviny sme stanovili podľa Hartree a spol.<sup>7</sup> Výsledky sme štatisticky vyhodnotili Studentovým t-testom. Hviezdičkou označujeme signifikantnosť na úrovni p<0,01.

Výsledky sú zhrnuté v tabuľke I. Z nich vyplýva, že aplikácia stobadínu v koncentrácii 0,1 mol.l<sup>-1</sup> vztiahnutá na 1 mg mitochondriálnej bielkoviny odlišne účinkuje na mitochondrie srdca a pečene. Respirácia srdcových mitochondrií je signifikantne inhibovaná, ATP-ázová aktivita je zvýšená, kým aktivita SOD sa nemení. Parametre u pečevých mitochondrií sú nezmenené, až na aktivitu SOD, ktorá je signifikantne znížená.

Porovnaním výsledkov je možné konštatovať, že stobadín v koncentrácii 0,1 mol.l<sup>-1</sup> negatívne ovplyvňuje funkciu srdcových mitochondrií, kým na pečevé mitochondrie v podstate nevyplýva. Uvedené skutočnosti sú v súlade s pozorovaním účinku na úrovni celého organizmu sledovanom v práci Guzy a spol.<sup>8</sup>

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu GA MŠ SR a SAV 1/6034/99.*

## LITERATÚRA

1. Pomfy M., Nicák A., Mojžiš J., Húska J., Beneš L.: *Neuropathology* 25, 115 (1995).
2. Guzy J., Cisár M., Barnová E., Beneš L.: *Pharmazie* 52, 408 (1997).

3. Mela L., Seitz S., v: *Methods in Enzymology*, str. 654. AP, New York 1979.
4. Johnson D., Lardy H., v: *Methods in Enzymology*, str. 94. AP, New York 1967.
5. Meisner J., v: *Methods in Enzymology*, str. 238. AP, New York 1974.
6. Shaper U., Kämpf A., Scheuch D. W.: *Z. Med. Lab. Diagn.* 27, 105 (1986).
7. Hartree E. F.: *Analyt. Biochem.* 48, 422 (1972).
8. Guzy J., Barnová E., Beneš L.: *Life Sci.* 65, 1936 (1999).

## 18 VPLYV KONCENTRAČNEJ ZÁVISLOSTI STOBADÍNU NA VYBRANÉ PARAMETRE PEČEVÝCH MITOCHONDRÍÍ

MÁRIA MAREKOVÁ, JURAJ GUZY,  
EVA BARNOVÁ, ZENÓBIA CHAVKOVÁ,  
VLADIMÍRA TOMEČKOVÁ a JAROSLAV KUŠNÍR

*Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská republika*

Stobadín, (-)-*cis*-2,8-dimetyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydroxo-1H-pyrido[4,3b]indol, možno charakterizovať ako látku s multikomponentným účinkom, ktorá zasahuje do periférnych aj centrálnych štruktúr bunky<sup>1</sup>. Na základe zistenia jeho chemickej reaktivity s voľnými radikálmi sa zaraďuje do skupiny tzv. scavengers – vychytávačov voľných radikálov<sup>2</sup>. Stobadín sa považuje za potenciálne liečivo v prevencii a liečbe tkanív poškodených oxidačným stresom<sup>3</sup>. Vzhľadom na to, že stále prebiehajú rozsiahle štúdie stobadínu, vrátane jeho predklinického hodnotenia, rozhodli sme sa sledovať jeho vplyv na pečevé mitochondrie, ktoré môžu iniciovať tvorbu reaktívnych foriem kyslíka.

V práci boli použité mitochondrie izolované z pečene potkanov štandardného chovu (samičky) rodu Wistar. Kontrolnú a pokusnú skupinu tvoril rovnaký počet vzoriek. Roztok stobadínu bol pridávaný tak, aby jeho výsledná koncentrácia bola 50, 100 a 200 mmol.l<sup>-1</sup>. Bola sledovaná spotreba kyslíka v stave 3 (s prídavkom ADP) a v stave 4 (bez prídavku ADP) elektródou Clarkovho typu, aktivita ATP-ázy, aktivita superoxididmutázy (SOD) a aktivita glutatiónereduktázy (GR). Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené oproti kontrole. Súčasne bolo uskutočnené monitorovanie mitochondriálnej dynamiky pomocou metódy synchronného fluorescenčného fingerprintu.

Prezentované výsledky predstavujú vplyv rôznych koncentracií stobadínu na mitochondriálne parametre pečevých mitochondrií.

Tabuľka I

Vplyv stobadínu na mitochondriálne parametre

	Kontrola	Stobadín		
		50 mmol.l <sup>-1</sup>	100 mmol.l <sup>-1</sup>	200 mmol.l <sup>-1</sup>
Stav 4	17,9±0,4	22,3±0,5	8,7±0,4	16,8±0,3
Stav 3	33,5±0,7	37,1±0,8	33,4±0,7	28,0±0,5
ATP-áza	0,154±0,009	0,155±0,007	0,162±0,005	0,151±0,007
SOD	0,271±0,05	0,171±0,07*	0,078±0,03*	0,017±0,07*
GR	86,8±5,6	138,1±5,6*	99,4±8,9	105,8±7,3*

trácii stobadínu (50–200 mmol.l<sup>-1</sup>) na spotrebu kyslíka v stave 3 a stave 4, ako aj sledované enzýmové aktivity a sú zhrnuté v tabuľke I. Sú udávané ako spotreba kyslíka v mmol/mg bielkoviny/min v oboch stavoch respirácie, aktivita ATP-ázy (E.C.3.6.1.3) v mmol P/mg bielkoviny/min, aktivita SOD (E.C.1.15.1.1) ako aktivita A/kg bielkoviny/min a aktivita GR (E.C.1.6.4.2) je v kat/mg bielkoviny. Získané absolútne hodnoty boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom na hladine významnosti p<0,05, čo je v tabuľke označené hviezdíčkou.

Naše výsledky ukazujú, že prídavok stobadínu výrazne neovplyvňuje spotrebu kyslíka v oboch stavoch respirácie, čo je v dobrej zhode aj so zistenými hodnotami ATP-ázovej aktivity. Tieto výsledky korešponujú s prácou Kaplan a spol.<sup>4</sup> Aktivita SOD, ktorá je považovaná za prvú líniu antioxidačnej obrany sa významne znížila pri vyšších koncentráciách, rovnako ako bolo popísané v práci Kuratka<sup>5</sup>, ktorý tento výsledok popisuje ako pokročilé štádium oxidačného stresu. Aktivita GR sa najprv zvýšila, pravdepodobne v dôsledku zvýšenej produkcie peroxidu vodíka a následnej zvýšenej koncentrácie oxidovaného glutatiónu. Následné zníženia aktivít oboch sledovaných enzýmov oproti kontrole bolo pravdepodobne spôsobené inhibíciou enzýmu vysokou koncentráciou substrátu – oxidovaného glutatiónu. S uvedenými výsledkami korešponduje aj monitorovanie vonkajšej mitochondriálnej membrány pomocou analýzy synchronného fluorescenčného fingerprintu.

Stobadín je látka so silným antioxidačným pôsobením, chrániaca syntetické aj prírodné lipidy pred spontánnou peroxidáciou indukovanou peroxidom vodíka. V tomto smere je účinnejší ako známe antioxidanty – butylovaný hydroxytoluén, alebo vitamín E (cit.<sup>6</sup>). Z uvedených výsledkov vyplýva, že stobadín nevlýva rovnako na enzýmy viazané na membrány mitochondrií (respirácia, ATP-áza) a enzýmy voľne sa vyskytujúce v matrix mitochondrie (SOD, GR). Mechanizmus tohoto rozdielu je pravdepodobne v interakcii molekuly stobadínu s prirodzenými substrátmi sledovaných enzýmov za vzniku radikálu stobadínu a ďalšieho metabolitu, resp. radikálu.

*Autori ďakujú za finančnú podporu grantu GA MŠ a SAV 1/6034/99.*

## LITERATÚRA

1. Štolc S., Bauer V., Beneš L., Tichý M.: Czech Pat. 229067 (1983).
2. Steenten S., Sundquist A. R., Jovanovic S. V.: Chem. Res. Toxicol. 5, 355 (1992).

3. Horáková L., Sies H., Steenten S., v: *Methods in Enzymology*, str. 572. Academic Press, New York 1994.
4. Kaplan P., Matejovičová M., Mézešová V.: Neurochem. Res. 12, 1523 (1997)
5. Kuratko C. N.: Toxicol. Lett. 11, 151 (1999).
6. Bezáková Ž., Jablonská D., Šveda P., Stankovičová M., Beneš L.: Česk. Slov. Farm. 46, 272 (1997).

## 19 BIOTRANSFORMATION IN THE LIVER DURING THE STEATOSIS AS A CONSEQUENCE OF TOXIC LIVER INJURY

OLGA ULIČNÁ<sup>a</sup>, IGOR BÁTORA<sup>b</sup>, JURAJ VOLMUT<sup>c</sup>, and OLGA VANČOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pharmacobiochemistry Laboratory, 3<sup>rd</sup> Internal Clinic, School of Medicine 811 05 Bratislava, <sup>b</sup>Department of Industrial Medicine and Toxicology, School of Medicine, 831 01 Bratislava, <sup>c</sup>Department of Clinical Biochemistry, Slovak Academy of Postgraduate Medicine, 831 01 Bratislava, Slovak Republic

Cytochrome P-450, monooxygenase acting as an oxidase or peroxidase, is involved in the metabolism and biotransformation of various endogenous and xenobiotic compounds. Most of the eucaryotic P-450s, a group of heme proteins, are located in the endoplasmic reticulum<sup>1</sup>, mitochondria<sup>2</sup> and peroxisomes<sup>3</sup>. Great number of xenobiotics which are eliminated by microsomal system of hepatocytes caused fatty liver.

The aim of our experimental study was to evaluate range of lipid infiltration (expressed as a concentration of triacylglycerols) in the liver and the biological half-life of antipyrine, the model substance eliminated by the liver after various types of toxic liver injury, after influence of two hepatotoxic compounds or after combination of hepatotoxic and hepatoprotective compounds. Experimental liver toxicity in Wistar rats (b.w. 160–180 g) was induced by 1) carbontetrachloride – CCl<sub>4</sub> (2.5 mmol.kg<sup>-1</sup>), 2) organophosphorous pesticide Phosmet (O,O-ftalimidomethyldithiophosphate, 145 mg.kg<sup>-1</sup>), 3) ethanol (10 g.kg<sup>-1</sup>) – administration by gastric tube and 4) hydrazine sulphate (2 mmol.kg<sup>-1</sup>) – administration subcutaneously. Combination of hydrazine sulphate after 24 hrs and ethanol after next 2 hrs were administered. Hepatoprotective substance silymarine (200 mg.kg<sup>-1</sup>) was applied 24 hrs after CCl<sub>4</sub> or 4 hrs after phosmet. Antipyrine (30 mg.kg<sup>-1</sup>) was applied

24 or 48 hrs after chemical compounds administration. Levels of plasma antipyrine were evaluated by gas chromatography<sup>4</sup>.

Single doses of mentioned toxic chemical compounds induced liver steatosis. In the liver tissue was significantly increased ( $p < 0.001$ ) concentration of triacylglycerols (TG  $\text{mmol.kg}^{-1}$ ) in comparison to control: 1) after  $\text{CCl}_4$ /48 hrs ( $126.79 \pm 13.65$  vs.  $11.23 \pm 1.32$ ), 2) after phosmet/24 hrs ( $40.60 \pm 2.85$  vs.  $11.87 \pm 0.83$ ), 3) after ethanol/24 hrs ( $44.63 \pm 0.42$  vs.  $10.44 \pm 0.73$ ) and 4) after hydrazine sulphate/24 hrs ( $71.10 \pm 4.65$  vs.  $8.06 \pm 0.81$ ). Biological half-life of antipyrine (in control group 1 hr 30 min) was prolonged after  $\text{CCl}_4$  on 11 hrs 56 min, phosmet on 2 hrs 48 min, ethanol on 2 hrs and hydrazine sulphate on 2 hrs 40 min. Combination of hydrazine sulphate and ethanol did not result in more expressive steatosis but half-life of antipyrine was prolonged on 6 hrs and 5 min. Silymarin led to steatosis reduction and shortening of antipyrine half-life after  $\text{CCl}_4$  (TG:  $85.42 \pm 8.39$   $\text{mmol.kg}^{-1}$ ,  $T_{1/2}$  8 hrs 31 min) as well as after phosmet (TG:  $25.26 \pm 1.59$   $\text{mmol.kg}^{-1}$ ,  $T_{1/2}$  1 hr 47 min).

Antipyrine half-life evaluation and treatment with hepatoprotective substances should be useful for people who are exposed to the influence of chemical compounds during the production, application or long drug administration. Decreased liver elimination possibility after toxic chemical compounds should be considered in medical practice.

This work was supported by VEGA Grant No. 1/5158/98.

## REFERENCES

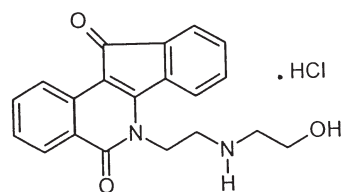
1. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: *FASEB J.* 6, 669 (1992).
2. Okuda K. I.: *J. Lipid. Res.* 35, 361 (1994).
3. Pahan K., Smith B. T., Singh A., K., Singh I.: *Free Rad. Biol. Med.* 7, 963 (1997).
4. Volmut J., Uličná O.: *Biochem. Clin. Bohemoslov.* 18, 313 (1980).

## 20 ÚČINOK ORACÍNU NA AKTIVITU TOPOIZOMERÁZY II IZOLOVANÚ Z PEČENE MYŠÍ

MILAN MIKO<sup>a</sup>, JÁN TURŇA<sup>b</sup>, STANISLAV STUHLÍK<sup>b</sup>, RADOMÍR SOUČEK<sup>c</sup> a MILAN MĚLKA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochémie a mikrobiológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, <sup>b</sup>Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, <sup>c</sup>Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Kouřimská 17, 130 60 Praha, Česká republika

Oracín (obr. 1) je pôvodná syntetická protinádorovo účinná látka zo skupiny indeisoquinolínov<sup>1</sup> a je štruktúrne a farmakologicky podobná klinicky používanému cytostatiku mitoxantrónu (NOVATRON<sup>®</sup>). Oracín vykázal priamu cytoto-



Obr. 1. Chemická štruktúra oracínu

xicitu voči širokému spektru nádorových a leukemických buniek *in vitro* a *in vivo*. Planárna základná štruktúra zlúčeniny je typická pre interkalačné protinádorové činidlá (antracyklíny, tj. látky podobné adriamycínu alebo antracéndionónu), tj. látkam podobným mitoxantrónu. Rovnako tiež pomer hodnôt  $IC_{50}$  pre inkorporáciu tymidínu a uridínu ( $R = 0,71$ ) je typický pre interkalačné látky<sup>1</sup>. Široké spektrum citlivých nádorov je však dôsledkom nielen interkalačného účinku oracínu, ktorý sa prejavuje inhibíciou biosyntézy DNA, RNA a následne aj proteínov, ale aj ovplyvnením bioenergetických procesov<sup>2</sup>. Oracín sa v súčasnosti nachádza v I. fáze klinického hodnotenia, kde bolo zahrnutých 28 pacientov<sup>3</sup>. Je relatívne málo toxický v širokom dávkovacom rozmedzí. Nevykazuje hepatotoxické, neurotoxické či kardiotoxické pôsobenie. Kľučár a Al-Rubeai<sup>4</sup> študovali cytotoxický účinok oracínu na bunky Burkittovho lymfómu (BL) s nadprodukciou bcl-2 génu a BL SV2 bunky (obsahuje kontrolný vektor). Expresia prežívajúceho génu ako bcl-2 génu v nádorových bunkách by mohla poskytnúť ochranu proti apoptóze indukovanej látkami, ktoré interferujú s replikáciou DNA nádorových buniek. Oracín vykázal značný cytostatický účinok na BL SV2 a BL bcl-2 bunky.

V našej práci sa študoval účinok oracínu na aktivitu topoizomerázy II, izolovanú z pečene myši v koncentračnej závislosti. Súčasne sa porovnal účinok aj na topoizomerázu I, tiež izolovanú z pečeni myši<sup>5</sup>. Po relatívne náročnom hľadaní koncentrácie, kde sa prejavuje inhibičný efekt oracínu na DNA topoizomerázu II sme zistili, že 50 % inhibícia topoizomerázy II nastáva pri konc. cca  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  oracínu. V prípade topoizomerázy I 30 % inhibícia sa zistila pri koncentrácii  $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$  oracínu.

Táto práca bola podporená grantom VEGA č.1/7315/20.

## LITERATÚRA

1. Mělka M. (ed.): *Oracin. Version: May 1994*. Archives of the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague 1994.
2. Mělka M., Miko M., Souček R., v: *XX xenobiochemické sympóziu, Smolenice 1999*, str. 32.
3. Souček R., Stanková J. a kol., v: *XX xenobiochemické sympóziu, Smolenice 1999*, str. 72.
4. Kľučár J., Al-Rubeai M.: *FEBS Lett.* 400, 127 (1997).
5. Miko M., Turna J., Stuchlik S., Souček R., Melka M.: *DMW/155X Conference 2000. St. Andrews, File, Scotland, 2000*.

## 21 REDUKCE ORACINU STŘEVNÍ MIKROFLOROU POTKANA

BARBORA SZOTÁKOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR WSÓL<sup>a</sup>,  
LENKA SKÁLOVÁ<sup>a</sup>, DRAHOSLAVA ŠÁFROVÁ<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR BUCHTA<sup>b</sup> a PETR JÍLEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemických věd, <sup>b</sup>Katedra biologických a lékařských věd, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Hlavním orgánem metabolismu léčiv jsou játra. K většině metabolických transformací dochází po absorpci léčiva z gastrointestinálního traktu. K některým přeměnám však může dojít už ve střevě nebo ve střevní stěně, kde se na metabolismu podílí bakteriální flora, pH střevního obsahu a oxidoredukční a konjugací enzymy buněk střevního epitelu<sup>1</sup>. Biotransformace ve střevě tak může nemalou měrou přispívat k biotransformaci léčiva *in vivo* a rovněž může omezovat biologickou dostupnost perorálně podávaných léků. Bakteriální flora gastrointestinálního traktu je velice komplexní<sup>2</sup> a jakákoli látka podaná perorálně nebo vstupující do střeva ze žluči nebo z krve se stává potenciálním substrátem pro střevní mikroorganismy<sup>3,4</sup>.

Oracin, derivát isochinolinu, {6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*]isochinolin hydrochlorid}, je účinná syntetická protinádorová látka určená pro orální podání. Mechanismus účinku je kombinovaný, částečně se jedná o interkalaci do molekuly DNA a RNA, částečně o stimulaci aerobní spotřeby glukosy, inhibici respirace, inhibici mitózy a indukci apoptózy nádorových buněk<sup>5</sup>. Jedním z hlavních metabolitů oracinu je 11-dihydrooracin (DHO), který byl nalezen u laboratorních zvířat *in vitro*<sup>6</sup> a *in vivo*<sup>7</sup> a je také hlavním metabolitem u člověka<sup>8</sup>. DHO je po i.v. aplikaci méně toxický než oracin, ale nemá protinádorový účinek<sup>5</sup>. V podmínkách *in vivo* se na redukci oracinu na DHO mohou podílet rovněž mikroorganismy ve střevě, kde je převážně anaerobní prostředí, podporující průběh redukčních reakcí.

Oracin byl perorálně podán v dávce 150 mg.kg<sup>-1</sup> standardním laboratorním potkanům kmene Wistar a Fischer a bezmikrobním potkanům kmene Fischer. Hladina DHO byla sledována v moči a trusu po 24, 48 a 72 hodinách metodou HPLC. Celkově bylo získáno více oracinu i DHO z trusu (77 % DHO v trusu ku 23 % v moči). U všech skupin potkanů byly maximální hodnoty DHO v moči detekovány první den, druhý a třetí den produkce klesala. U trusu bylo maximální množství DHO získáno druhý den. Množství vzniklého DHO je u bezmikrobních potkanů Fischer (F1) a potkanů Fischer po konvencionalizaci (osídlení GITu střevní mikroflorou) (F2) rozdílné, do trusu je více DHO vylučováno u potkanů F2. Eliminace DHO do moči je u potkanů Wistar (W) strmější (2. a 3. den prudce klesá), zatímco u trusu jsou hladiny 1. a 2. den poměrně vyrovnané oproti potkanům F1 a F2. Rozdíly v metabolismu mezi potkany kmenů Wistar a Fischer jsou pravděpodobně způsobeny genetickými rozdíly a chovem v odlišných laboratorních podmínkách. Také byla provedena anaerobní kultivace bakterií střevní mikroflory s oracinem v podmínkách *in vitro*. Ve vzorku, kde bylo pouze kultivační medium a malé množství střevního obsahu došlo k výraznému pomnožení bakterií, zatímco ve zkušence i s oracinem byla pozorova-

vatelná pouze jemná opalescence. Oracin tedy pravděpodobně inhibuje růst některých bakterií. DHO vzniklo malé množství a to přibližně 3 % z celkového množství přidaného oracinu.

Naším dalším cílem je určení, zda se ve střevě na biotransformaci podílí pouze intestinální mikroflora či zda se na těchto přeměnách účastní i enzymy epitelálních buněk střevní stěny.

Podporováno Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, grant č. 96/2000/C a výzkumným projektem MŠMT ČR J13/98: 11600002.

## LITERATURA

1. Ilett K. F., Tee L. B., Reeves P. T., Minchin R. F.: *Pharmacol. Ther.* 46, 67 (1990).
2. Moore W. E. C., Moore L. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3202 (1995).
3. Chadwick R. W., George S. E., Claxton L. R.: *Drug. Metab. Rev.* 24, 425 (1992).
4. Henderson A. L., Schmitt T. C., Heinze T. M., Cerniglia C. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4099 (1997).
5. Mělka M., Miko M., Souček R.: *XX. Xenobiochemické sympóziium, Zborník súhrnov*, str. 32 (1999).
6. Szotáková B., Wsól V., Trejtnar F., Skálová L., Kvasničková E.: *Exp. Toxicol. Pathol.* 48 II, 377 (1996).
7. Wsól V., Kvasničková E., Szotáková B., Hais I. M.: *J. Chromatogr. B*, 681, 169 (1996).
8. Wsól V., Szotáková B., Kvasničková E., Fell A. F.: *J. Chromatogr. A*, 797, 197 (1998).

## 22 EFFECT OF DOXORUBICIN ON PROTEIN SYNTHESIS AND PROTEOLYTIC ENZYME ACTIVITIES IN RAT CARDIAC MUSCLE

TOMÁŠ ZIMA<sup>a</sup>, VLADIMÍR TESAŘ<sup>a</sup>,  
DAVID MANTLE<sup>b</sup>, MICHAEL KOLL<sup>c</sup>,  
VINOOD PATEL<sup>c</sup>, PETER J. RICHARDSON<sup>d</sup>,  
and VICTOR R. PREEDY<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Institute of Clinical Chemistry, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague 2, Czech Republic, <sup>b</sup>Department of Neurochemistry, Regional Neurosciences Centre, Newcastle General Hospital, Upon-Tyne Newcastle-Upon-Tyne, UK, <sup>c</sup>Departments of Clinical Biochemistry and <sup>d</sup>Cardiology, Guy's, King's and St. Thomas' Medical School, King's College, <sup>e</sup>Department of Nutrition and Dietetics, King's College London, UK

Anthracycline antibiotics are effective anti-cancer agents but their use is limited by unwanted adverse side-effects. The toxic effects of doxorubicin (adriamycin) include the development of defined cardiac lesions leading to cardiomyopathy in some patients. The structural alterations may result from free radical formation and /or reduced antioxidant status. Other processes proposed as contributory to the mechanism of adriamycin-induced cardiomyopathy, include inhibition of oxidative phosphorylation and reductions of mitochondrial ATPase activities and suppression of carnitine palmitoyltransferase activities. Adriamycin-induced cardiomyopathy has also been reported to be due to reductions in cardiac protein synthesis.



Table I

Heart protein synthesis parameters and cardiac lysosomal and cytoplasmatic peptidase activities (nmol hydrolysed substrate/h/mg protein) in rats treated with adriamycin *in vivo*

Parameter	Units	24 S	24 A	2.5 S	2.5 A
S <sub>i</sub> heart	dpm/nmol	80.6±3.7	72.7±1.0 <sup>a</sup>	77.8±0.7	78.7±0.7
S <sub>b</sub> heart	dpm/nmol	0.073±0.003	0.063±0.002 <sup>b</sup>	0.08±0.002	0.078±0.001
k <sub>s</sub> heart	%/day	13.1±0.8	12.4±0.4	14.7±0.3	14.2±0.2
k <sub>RNA</sub> heart	mg prot/day/mg RNA	13.0±0.8	12.7±0.7	13.9±0.8	14.1±0.8
Lysosomal enzymes					
diaminopeptidase I		693±30	788±47	758±66	634±31 <sup>a</sup>
diaminopeptidase II		89±18	99±12	98±6	101±9
Cathepsin L		248±23	305±29	320±30	272±11
Cathepsin B		65±4	67±8	67±6	64±3
Cathepsin H		92±6	91±6	99±9	94±4
Cathepsin D		4.01±0.72	4.02±0.54	3.46±0.32	4.58±0.45
Cytoplasmatic enzymes					
Alanyl aminopeptidase		384±33	394±40	409±22	422±18
Arginyl aminopeptidase		616±37	640±49	623±21	693±20
Leucyl aminopeptidase		53±7	60±7	66±5	63±4
Diaminopeptidase IV		81±4	71±6	86±5	94±4
Triaminopeptidase		56±7	66±8	44±4	54±3
Proline endopeptidase		171±15	127±22 <sup>a</sup>	184±23	162±12

<sup>a</sup> p<0.05, <sup>b</sup> p<0.001

However, virtually all of these previous studies on protein synthesis have failed to consider the specific radioactivity of the precursor pool in their measurements or have carried out their studies *in vitro*<sup>1-3</sup>.

To further resolve the above we measured fractional rates of cardiac protein synthesis using the *flooding dose* method in rats (8 in group) treated with adriamycin (5 mg.kg<sup>-1</sup> body weight). Controls were identically treated and injected with saline. At 2.5 or 24 hours after adriamycin injection, rates of protein synthesis were measured with a *flooding dose* of L-[4-<sup>3</sup>H]-phenylalanine. Measurements included free (S<sub>i</sub>) and protein bound (S<sub>b</sub>) phenylalanine specific radioactivities, the protein synthetic capacity (RNA/protein ratio; C<sub>s</sub>), the fractional rates of protein synthesis calculated from the ratio of S<sub>b</sub>/S<sub>i</sub> and the protein synthetic efficiency calculated from the ratio of k<sub>s</sub>/C<sub>s</sub>. Complementary analysis included assays of lysosomal (cathepsins B, D, H and L and dipeptidyl aminopeptidases I and -II) and cytoplasmic proteases (alanyl aminopeptidase, arginyl aminopeptidase, leucyl aminopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase IV, tripeptidyl aminopeptidase and proline endopeptidase). These enzymes constitute the most active proteases in this tissue and represent an index of protein degradation capacity in cardiac muscle<sup>4-6</sup>.

The results showed that in 2.5 hour dosed rats, adriamycin had no effect on S<sub>i</sub>, S<sub>b</sub>, C<sub>s</sub>, k<sub>s</sub> or k<sub>RNA</sub>. In 2.5 hour dosed rats, dipeptidyl aminopeptidase I activities were reduced (p<0.05) whereas the activities of other peptidases were not significantly altered.

In 24 hour dosed rats, adriamycin reduced cardiac S<sub>b</sub> (p<0.001), which would normally be interpreted as a reduction in protein synthesis. However, S<sub>i</sub> was also decreased in 24 hour

adriamycin-injected rats (p<0.05) and C<sub>s</sub> was not changed. Consequently, the calculated k<sub>s</sub> and k<sub>RNA</sub> values were not significantly affected in 24 hour adriamycin-dosed rats. There were also significant reductions in proline endopeptidase activities in rats exposed for 24 hours to adriamycin. The activities of other peptidases were not significantly affected at this time point (Table I).

In conclusion, there is reduced labelling of myocardial proteins in rats treated with adriamycin and then injected with L-[4-<sup>3</sup>H]-phenylalanine. However, this can not be interpreted as a reduction in the rate of myocardial protein synthesis *in vivo* due to reduction in the enrichment of the precursor pool. There are, nevertheless, subtle changes in the activities of selected proteases, which may contribute to the development of adriamycin-induced toxicity. There was no evidence that adriamycin-induced cardiomyopathy occurs via generalised alteration (i.e., activation) of intracellular proteolysis in the heart.

## REFERENCES

1. Ferrans V. J., Clark J. R., et al.: *Tsitologiya* 39, 928 (1997).
2. DeAtley S. M., Aksenov M. Y., et al.: *Cancer Lett.* 136, 41 (1999).
3. Mazzanti L., Breschi M. C., et al.: *In Vivo* 2, 189 (1988).
4. Garlick P. J., McNurlan M. A., Preedy V. R.: *Biochem. J.* 192, 719 (1980).
5. Siddiq T., Richardson P. J., Preedy V. R.: *Biochem. Med. Metab. Biol.* 49, 149 (1993).
6. Preedy V. R., Why H., et al.: *Int. J. Cardiol.* 50, 95 (1995).

## 23 MIKROZÓMOVÉ ESTERÁZY VO VZŤAHU K BENZOYLCHOLÍNOM *IN VITRO*

INGRID PAULÍKOVÁ<sup>a</sup>, OTTO HELIA<sup>a</sup>, ANNA HRABOVSKÁ<sup>a</sup> a FERDINAND DEVÍNSKY<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, <sup>b</sup>Katedra chemickej teórie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

Organické amóniové soli (OAS) typu *N*-(2-benzoyloxyetyl)-alkyldimetylamónium bromidov boli syntetizované na Katedre chemickej teórie liečiv skupinou prof. Devínskeho a kol. Uvedený homologický rad BCH<sub>*n*-1</sub> sa vo všeobecnosti vyznačuje pomerne silnými antimikróbnyimi účinkami, zvlášť na grampozitívne bakteriálne kmene. Vzhľadom na ich štruktúru ich radíme medzi „soft“ -antimikróbne účinné látky.

Prítomnosť esterovej väzby naznačuje miesto prednostného ataku biotransformačnými enzýmami. Závislosť rýchlosti enzymovej hydrolýzy významne ovplyvňuje štruktúrna modifikácia jednotlivých substrátov na amóniovom dusíku. Závislosť je nelineárna s tromi maximami pre substráty BCH2>BCH4>BCH8. Po prekročení kritickej micelovej koncentrácie (od BCH 10) rýchlosť enzymovej hydrolýzy prudko klesá a stabilizuje sa u substrátov BCH14>BCH16>BCH18 na hodnotách blízkyh nule. Nelineárne závislosti biologických účinkov od štruktúry a fyzikálno-chemických vlastností dlhoreťazcových amfifilných molekúl tzv. cut-off efekt je všeobecne známym farmakologickým fenoménom.

Rýchlosť enzymovej hydrolýzy dokumentuje sice vzťah medzi chemickou štruktúrou a biotransformačným hydrolytickým procesom, ale bližšie nešpecifikuje enzým zodpovedný za túto biotransformačnú reakciu a vzťah substrátu k aktívnemu miestu enzýmu. Významný je aj podiel participácie rôznych typov mikrozómových esteráz na enzymovej hydrolýze OAS a vyselektovanie zodpovednej esterázy pre dané štruktúry. Vzťah jednotlivých substrátov k aktívnemu miestu mikrozómovej cholinesterázy ešte významnejšie závisí od chemickej štruktúry ako rýchlosť a je orgánovo špecifický. V pečení potkana najrýchlejšie hydrolyzované substráty BCH1–BCH4 majú veľmi vysokú afinitu k aktívnemu centru mikrozómovej esterázy, dokumentovanou biochemickou konštantou  $K_M$  rádovo  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Substráty so strednou rýchlosťou hydrolýzy majú hodnotu  $K_M = 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> – hodnota bežná pre xenobiotiká, ale substráty veľmi pomaly hydrolyzované v dôsledku vytvorenia micel, majú hodnotu  $K_M = 10^{-2}$  mol.l<sup>-1</sup>. Táto vysoká hodnota koreluje s poznatkom, že micely nie sú schopné vzhľadom na svoju veľkosť a tvar vytvoriť komplementárne nekovalentné interakcie so zodpovednými väzbovými miestami aktívneho centra enzýmu.

Korelácia medzi rýchlosťou enzymovej hydrolýzy a afinitou jednotlivých homologov v pečení potkana (s postupným poklesom špecifickej aktivity klesala aj afinita) nadobúda inverzný charakter medzi antimikróbnu aktivitou a rýchlosťou hydrolýzy jednotlivých substrátov.

*Autori ďakujú za podporu riešenia projektu MŠ SR (grant č. 1/7277/20).*

## 24 BUTYRYLCHOLÍNESTERÁZA – ENZÝM ZODPOVEDNÝ ZA HYDROLÝZU BENZOYLCHOLÍNOM

ANNA HRABOVSKÁ<sup>a</sup>, INGRID PAULÍKOVÁ<sup>a</sup>, OTTO HELIA<sup>a</sup> a FERDINAND DEVÍNSKY<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, <sup>b</sup>Katedra chemickej teórie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

Zavŕšením biotransformačných štúdií organických amóniových solí (OAS) typu *N*-(2-benzoyloxyetyl)-alkyldimetylamónium bromidov pracovného označenia BCH<sub>*n*-1</sub> s dĺžkou alifatického reťazca na amóniovom dusíku BCH1–BCH18 bolo vyšpecifikovanie zodpovednej esterázy za ich esterolýzu ako primárny enzymový atak.

Náš predpoklad, že na hydrolytickom procese OAS na základe chemickej štruktúry najvýznamnejšie participuje butyrylcholínesteráza sme overovali kinetickými inhibičnými štúdiami za použitia fyzostigmínu ako reverzibilného inhibítora cholinesteráz. Fyzostigmín významne zasiahol do biodegradácie esterovej väzby už pri koncentráciách  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>. 50 % inhibícia sme zaznamenali pri koncentracii fyzostigmínu  $6 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Špecifikácia enzýmu zodpovedného za esterolýzu OAS bola doplnená štúdiom vplyvu rôznej dĺžky alifatického reťazca substrátov na inhibičný účinok fyzostigmínu.

Porovnávali sme krátko- a strednoreťazcové homology BCH2 a BCH8. Chemická štruktúra substrátov zmenila typ kinetiky inhibície z nekompetitívnej pre BCH2 na zmesnú pre BCH8. Dlhší alkyl znamená priestorovú zábranu nekovalentnej interakcie inhibítora s ES komplexom sprevádzanú zvýšením hodnôt  $K_I$ .

*Autori ďakujú za podporu riešenia projektu MŠ SR (grant č. 1/7277/20).*

## 25 POROVNÁNÍ *IN VITRO* REDUKCE KARBONYLOVÉ SKUPINY BENFLURONU A DIMEFLURONU

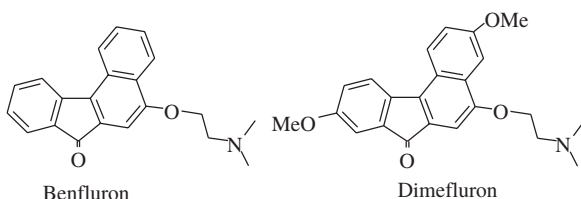
LENKA SKÁLOVÁ<sup>a</sup>, ELIŠKA KONDROVÁ<sup>a</sup>, VENDULA BALIHAROVÁ<sup>a</sup>, BARBORA SZOTÁKOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR WSÓL<sup>a</sup> a MILAN NOBILIS<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemických věd, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, <sup>b</sup>Ústav experimentální biofarmacie, AV ČR a PRO.MED.CS. a.s., Heyrovského 1207, 500 02 Hradec Králové

Cílem vývoje nových léčiv je objevit léčivé látky s optimálními terapeutickými vlastnostmi, tj. s co nejvyšší žádoucí aktivitou a co nejmenším výskytem nežádoucích účinků. Tohoto cíle lze dosáhnout pomocí studia vztahů mezi strukturou a aktivitou, strukturou a metabolismem a také mezi strukturou a toxicitou. Metabolismus xenobiotik je stejně jako všechny ostatní biologické odpovědi závislý na molekulární struktuře

látky. Na rozdíl od pasivních procesů, kde hraje hlavní roli rozpustnost a lipofilita, je biotransformace závislá na všech aspektech molekulární struktury, včetně sterických a elektronových vlastností<sup>1</sup>.

Benfluron (5-(2-*N,N'*-dimethylaminoethoxy)-7-oxo-7*H*-benzo[*c*]fluoren hydrochlorid) je potenciální cytostatikum vyvinuté ve VÚFB v Praze<sup>2</sup>. S cílem eliminovat některé nežádoucí vlastnosti benfluronu při zachování event. zvýšení jeho účinku a ostatních vlastností žádoucích bylo připraveno a testováno několik dalších derivátů benfluronu. Dvakrát vyšší cytostatickou aktivitu ve srovnání s benfluronem vykazoval 9-hydroxybenfluron<sup>3,4</sup>. Ještě lepší výsledky by bylo možné očekávat u 9-methoxybenfluronu (snazší průnik přes membrány), avšak oba tyto deriváty nelze připravit chemickou syntézou. V současné době je proto testován dimefluron (3,9 dimethoxybenfluron).



Jedním z hlavních metabolitů benfluronu je 7-dihydrobenfluron (DHB) vzniklý redukcí karbonylové skupiny. Touto redukcí dojde k porušení planárního tvaru molekuly a tím ke ztrátě interkalační schopnosti. Redukce karbonylové skupiny tak představuje reakci deaktivující, tudíž ve větší míře reakci nežádoucí. Výtěžek 7-dihydrobenfluronu byl porovnáván s výtěžkem 7-dihydrodimefluronu *in vitro*. Jelikož redukcí karbonylu xenobiotik může katalyzovat řada reductas<sup>1</sup>, byly oba substráty inkubovány postupně jak s mikrosomy, tak cytosolem, s koenzymy NADPH nebo NADH, v aerobních i anaerobních podmínkách. Výsledky shrnuje tabulka I.

Dosažené výsledky naznačují, že methoxy skupiny na benzo[*c*]fluorenovém skeletu významně snižují míru redukce karbonylové skupiny. Dimefluron by tak mohl být v organismu pomaleji deaktivován než benfluron.

Tabulka I

Redukce benfluronu a dimefluronu *in vitro*, množství substrátu v reakci = 100 %

	7-Dihydro-	
	benfluron [%]	dimefluron [%]
Mikrosomy, NADPH, kyslík	16,2	7,4
Mikrosomy, NADPH, Ar	22,3	8,5
Mikrosomy, NADH, kyslík	13,3	,9
Mikrosomy, NADH, Ar	17,2	3,4
Cytosol, NADPH, kyslík	6,9	3,3
Cytosol, NADPH, Ar	9,0	3,9
Cytosol, NADH, kyslík	3,3	2,7
Cytosol, NADH, Ar	3,1	2,8

Tato práce byla podpořena grantem UK 247/1998/C a výzkumným projektem MŠMT ČR J13/98:111600002.

## LITERATURA

1. Testa B., Caldwell J., ed.: *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. Biochemistry of Redox Reactions.* Academic Press, London 1995.
2. Křepelka J.: *Cesk Farm.* 34, 17 (1985).
3. Miko M., Křepelka J., Mělka M.: *Anti-Cancer Drugs* 2, 289 (1991).
4. Miko M., Křepelka J., Nobilis M.: *Anti-Cancer Drugs* 3, 63 (1992).

## 26 VYUŽITÍ HEPATOCYTŮ PŘI STUDIU BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ U PŘEŽVÝKAVCŮ

LENKA SKÁLOVÁ<sup>a</sup>, BARBORA SZOTÁKOVÁ<sup>a</sup>,  
FRANTIŠEK TREJTAR<sup>b</sup>, ILONA VAŇKOVÁ<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR WSÓL<sup>a</sup>, MIROSLAV MACHALA<sup>c</sup>  
a JIŘÍ LAMKA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemických věd, <sup>b</sup>Katedra farmakologie a toxikologie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 501 65 Hradec Králové, <sup>c</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Význam studia biotransformačních procesů u hospodářských zvířat a lovné zvěře narůstá nejen stálým nebezpečím kontaktu s průmyslovými či zemědělskými kontaminanty, ale i se stále širším využitím farmakologicky účinných látek. Ve snaze zajistit dobrý zdravotní stav zvířat a usnadnit manipulaci se zvířaty jsou ve všech současných typech chovů užívány látky charakteru léčiv k terapeutickým a profylaktickým účelům, či jako součást výživy nebo biotechnických zásahů. Důležitou podmínkou účinného a bezpečného užití léčiv je znalost biotransformačních enzymů u jednotlivých živočišných druhů, neboť aktivita biotransformačních enzymů zásadním způsobem ovlivňuje toxikologický i farmakologický účinek xenobiotika<sup>1</sup>. Výzkum metabolických přeměn nejen léčiv, ale obecně všech xenobiotik, je z největší části založen na experimentální práci s laboratorními zvířaty. Obrovské mezi-druhové rozdíly v zastoupení, aktivitě, substrátové specifitě a indukovatelnosti biotransformačních enzymů značně omezují možnost extrapolace dat získaných u laboratorních zvířat na jiné živočišné druhy<sup>2,3</sup>. V humánní medicíně jsou pro registraci nových léčiv a přípravků nezastupitelné experimenty s lidskými preparáty, neboť v toxikologii a farmakologii je na detailní znalost enzymů zodpovědných za biotransformace každého potenciálního léku i škodliviny u člověka kladen obrovský důraz. Podobný přístup byl dosud opomíjen u přežvýkavých hospodářských i volně žijících zvířat<sup>4,5</sup>.

S cílem získat co nejvíce informací o vlastnostech biotransformačních enzymů a metabolismu xenobiotik u hospodářských i volně žijících přežvýkavců je v rámci našeho projektu zaváděna metoda izolace a kultivace hepatocytů. Izolované hepatocyty jsou dnes rozšířeným experimentálním modelem, který je používán řadou autorů ve fyziologických, biochemických a farmakologických studiích. Na rozdíl od metod pracujících na subcelulární úrovni umožňuje tento metodický přístup zkoumání jaterních procesů při zachování integrity buněk. V izolovaných hepatocytech je možné nejen sledovat metabolismus určitého xenobiotika, ale hepatocyty

Ize využít i k testování indukční odezvy či lékové interakce. Jaterní buňky jsou standardně izolovány z jater malých laboratorních zvířat pomocí recirkulační perfúze celého orgánu *in situ* roztokem kolagenasy<sup>6</sup>. Pro získání hepatocytů z jater přežvýkavců je nezbytné tento standardní izolační postup modifikovat. Při našich experimentech jsme vycházeli z modifikací vyvinutých pro izolaci hepatocytů z jater prasete a člověka<sup>7,8</sup>. Jak ukázaly naše dosavadní experimenty úspěšnost izolačního postupu nejvíce závisí na použité kolagenase (lepší výsledky byly dosaženy s kolagenasou ze Sevapharmy oproti kolagenase ze Sigmy) a její koncentraci, na dostatečném promytí kousku jater předmyvacím roztokem a na průtoku a době perfúze (tab. I) jater kolagenasou.

Omezujícím faktorem běžně používané modifikace, tj. suspenze buněk získaných rozvolněním jater kolagenasou, je rychlá ztráta životnosti buněk (během 1–2 hod) a rozdílnost jednotlivých vzorků. Zvýšení stability hepatocytárního preparátu lze dosáhnout imobilizací jaterních buněk na vhodném nosiči a volbou optimálního media. Proto naším dalším cílem je zavedení vhodné imobilizační a inkubační procedury, při které budou zachovány všechny nativní vlastnosti biotransformačních enzymů po co nejdelší dobu.

Tabulka I

Vliv doby perfúze jater kolagenasou na životnost hepatocytů

Vzorek jater	Doba promývání kolagenasou	Výtěžek suspenze	Počet buněk v 1 ml	Životnost
Jelen 1	15–20 min	20 ml	7.10 <sup>5</sup>	2 %
Skot 1	10 min	25 ml	27.10 <sup>5</sup>	30 %
Skot 2	10 min	15 ml	18.10 <sup>5</sup>	70 %
Jelen 2	8 min	4,5 ml	24.10 <sup>5</sup>	85 %
Daněk 1	8 min	12 ml	20.10 <sup>4</sup>	95 %
Daněk 2	8 min	21 ml	40.10 <sup>4</sup>	80 %
Daněk 3	8 min	4,5 ml	80.10 <sup>4</sup>	90 %
Jelen 3	7 min	11,5 ml	12.10 <sup>5</sup>	85 %

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 524/00/0514.

## LITERATURA

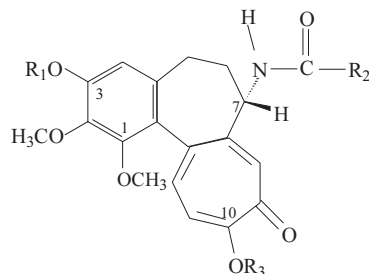
1. Testa B., Caldwell J. (ed): *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. Biochemistry of Redox Reactions*, Academic Press, London, 1995.
2. Boobis A. R., et al: *Xenobiotica* 20, 1139 (1990).
3. Smith D. A.: *Drug Metab. Rev.* 23, 355 (1991).
4. Fink-Gremmels J., Van Miert A. S. J. P. A. M.: *Analyst* 119, 2521 (1994).
5. Fink-Gremmels J., Van Miert A. S. J. P. A. M.: *J. Exp. Pathol.* 48 (II), 120 (1996).
6. Moldéus P., Högborg J., Orrenius S.: *Method Enzymol.* 51, 60 (1978).
7. Li A.P., et al.: *Chem-Biol. Interact.* 107, 5 (1997).
8. Ulrichová J.: ústní sdělení

## 27 ÚČINEK KOLCHICINOIDŮ NA LIDSKÝ HEPATOCYT

ZDENĚK DVOŘÁK<sup>a</sup>, PAVEL KOSINA<sup>b</sup>  
a JITKA ULRICHOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta UP, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, <sup>b</sup>Centrum analytické chemie molekulárních struktur, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Kolchicin je hlavním alkaloidem rodu *Colchicum* (Liliaceae). Extrakty z hlíz ocúnu jesenního byly používány již v 6. století k léčbě dny (akutní dnové artritidy). V současné době je kolchicin aplikován u středozevní vrozené horečky, některých typů dermatitid a primární biliární cirhózy<sup>1</sup>. Kolchicin má antimitotickou a protizánětlivou aktivitu. Pro člověka je toxický při dávkách nad 1 mg/den, proto byla připravena řada derivátů, s nižší toxicitou a se zachovaným biologickým účinkem. V příspěvku jsou uvedeny účinky kolchicinu (*I*), jeho hlavních metabolitů u člověka 3-demethylkolchicinu (*II*) a kolchiceinu (*V*) a některých derivátů – demekolcinu (*III*), *N*-deacetylkolchiceinu (*VI*) a kolchikosidu (*IV*) na lidský hepatocyt (LH). Na modelu LH, s výjimkou kolchicinu (*I*), nebyly dosud kolchicinoidy studovány. Játra byla získána od multiorgánových dárců v souladu s platnou českou legislativou. LH byly izolovány standardní dvoustupňovou kolagenasovou perfúzí<sup>2</sup>. Hepatocyty byly suspendovány v mediu William's E obohaceném aditivou a 5 % prekolostální séra, vysety v hustotě 7,96.10<sup>5</sup> buněk/ml na prekolagenované kultivační desky a inkubovány 4 hod pro uchycení buněk. Po výměně media za bezsérové byly buňky vystaveny působení testovaných sloučenin v koncentracích 1, 10 a 100 μmol.l<sup>-1</sup> po dobu 24 a 48 hod. Kvalita primární kultury byla hodnocena mikroskopicky. Toxicita látek byla sledována stanovením: aktivity uvolněné laktátdehydrogenasy (LDH) a alkalické fosfatasy (ALP), albuminu sekretovaného do media a celkovým obsahem bílkoviny.



Sloučenina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<i>I</i> Kolchicin	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>II</i> 3-Demethylkolchicin	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>III</i> Demekolcin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>IV</i> Kolchikosid	glu	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>V</i> Kolchicein	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	H
<i>VI</i> <i>N</i> -Deacetylkolchicein	CH <sub>3</sub>	H	H

Obr. 1. Struktura kolchicinu a jeho derivátů

Aktivita LDH byla po 24 hod signifikantně zvýšena vůči kontrole působením alkaloidů *I* (100 μmol.l<sup>-1</sup>, 29 %) a *II* (od 10 μmol.l<sup>-1</sup>, 26 %). Sekrece albuminu byla snížena u *I* (od



1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , -37 %), *II* (od 1  $\mu\text{M}$ , -25 %), *III* (od 1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , -46 %), *V* (100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , -87 %) a *VI* (100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , -58 %). Celkový obsah bílkoviny v kultuře nebyl žádnou z testovaných sloučenin statisticky významně ovlivněn. Aktivita ALP v mediu byla zvýšena působením *I* (100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 46 %) a *V* (100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , 57 %).

Z testovaných sloučenin membránu lidského hepatocytu poškozuje (parametr LDH) kolchicin (*I*) a jeho metabolit *II* (10× větší cytotoxicita). ALP je zvýšena působením kolchicinu (*I*) a kolchiceinu (*V*). Sekreci albuminu snižují alkaloidy v pořadí *III* > *I* > *II* > > > *VI* > *V*. Žádný z parametrů poškození LH nebyl ovlivněn kolchikosidem (*IV*). *O*-Demethylace na C-10 (*V* a *VI*) vede k výraznému snížení cytotoxicity ve srovnání s *O*-methylderiváty. *O*-Demethylace na C-3 má efekt opačný.

Autoři děkují za finanční podporu grantům MSM 151100003 a VS 96021 MŠMT ČR a grantu NL 5267-3/1999 IGA MZ ČR.

## LITERATURA

1. Ben-Chetrit E., Levy M.: Semin. Arthritis Rheum. 28, 48 (1998).
2. Jones G. E., v: *Methods in Molecular Medicine*, str. 369. Humana Press Inc., New Jersey 1996.

## 28 BIOTRANSFORMATION OF SILYBIN DIASTEREOMER A IN RAT AND PORCINE HEPATOCYTES

PAVEL KOSINA<sup>a</sup>, ZDENĚK DVOŘÁK<sup>b</sup>,  
JITKA ULRICOVÁ<sup>b</sup>, and DANIELA WALTEROVÁ<sup>b</sup>

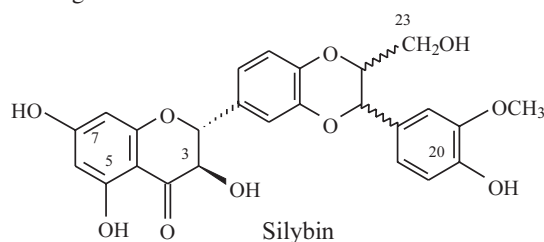
<sup>a</sup>Centre for Bioanalytical Research, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, <sup>b</sup>Institute of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

Silybin, the main flavonolignan from *Silybum marianum* seeds, is well recognised as an antioxidant and free radical scavenger with the capacity for regenerating liver cells<sup>1</sup>. Silybin alone is a mixture of two diastereomers *A* and *B* in approx. proportion 1:1. Silybin is biotransformed like most drugs and xenobiotics to more hydrophilic and removable conjugates. In experiments carried out on rats and in clinical trials the glucuronides and sulphates have been found to be the main silybin metabolites<sup>2,3</sup>. The silybin molecule offers several possible target hydroxy groups with a different chemical character (C-3, 5, 7, 20 and 23) for conjugation. Recently several silybin glucuronides (20-*O*- $\beta$ -D-, 7-*O*- $\beta$ -D- and 5-*O*- $\beta$ -D-) have been synthesised by chemoenzymatic glucuronidation using ovine liver glucuronyl transferase<sup>4</sup>.

The aim of the present contribution was to investigate silybin conjugate formation in primary cultures of rat and porcine hepatocytes. Hepatocytes were isolated in a two-step collagenase perfusion and cultivated on collagen type I coated dishes in serum free medium (William's E and William's Ham

F12 respectively). Following the addition of silybin (dissolved in DMSO) to the culture medium (final silybin concentration 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) the medium was collected at 4, 8, and 24 hour time intervals, and stored at -20 °C before conjugate analyses. For direct determination of silybin and its conjugates, the HPLC method with SPE was used<sup>4</sup> with 20-*O*- $\beta$ -D- and 7-*O*- $\beta$ -D-glucuronides of silybin diastereomer *A* as standards. Analyses were carried out on Shimadzu Class – LC 10 with DAD detector (Shimadzu, Japan). Analytes were isolated by a solid phase extraction from culture medium acidified by 0.1 mol.l<sup>-1</sup> acetic buffer to pH 4 using Spe-ed Octadecyl C18/18 %, 200 mg/3 ml (Applied Separations, USA) columns, then eluted with methanol and acetone, evaporated, and dissolved in a mobile phase A. The analyses were performed on a column (250x4 mm) Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub> AB, guard column (11x4 mm) with the same sorbent (Macherey Nagel, Germany) using a gradient (phase A: MeOH–H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>COOH 37:63:0.5; phase B: MeOH, gradient program – min/% B: 0/0, 3.75/10, 11.25/35, 15/100, 20/100, 20.1/0, 27/STOP). Flow rate was 0.9 ml.min<sup>-1</sup>, temperature 30 °C, UV detection at 290 nm, and applied volume 50  $\mu\text{l}$ . The amount of total conjugated silybin was evaluated after enzymatic cleavage of medium samples by  $\beta$ -glucuronidase/arylsulphatase from *Helix pomatia* (Merck, Germany).

We found that both primary cultures of rat and porcine hepatocytes converted silybin to several hydrophilic metabolites, namely glucuronides and sulphates. Silybin was almost completely metabolised within 24 h cultivation. The disappearance of silybin from cell medium was more rapid in porcine hepatocyte cultures. The metabolite profiles as well as the rate of silybin biotransformation were different in rat and porcine hepatocytes. Among silybin conjugates we identified 7-*O*- $\beta$ -D- and 20-*O*- $\beta$ -D-glucuronides of silybin diastereomer *A*. The latter appears to be the dominant product of silybin diastereomer *A* biotransformation in porcine hepatocytes. This metabolite was also identified in the plasma of healthy human volunteers after oral intake of silymarin<sup>4</sup>. Further metabolites (including metabolites of silybin diastereomer *B*) are the subject of follow-up studies using hepatocyte primary cultures as a promising model.



This work was supported by grants VS 96021 and MSM 151100003 from Ministry of Education of the Czech Republic and grants 303/98/0414 and 311/98/0648 from the Grant Agency of the Czech Republic.

## REFERENCES

1. Morazzoni P., Bombardelli E.: Fitoterapia 66, 3 (1995).
2. Sonnenbichler J., Mattersberger J., Hanser G.: Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 1751 (1980).

3. Flory P. J., Krug G., Lorenz D., Mennicke W. H.: *Planta Med.* 38, 227 (1980).
4. Křen V., Ulrichová J., Kosina P., Stevenson D., Sedmera P., Přikrylová V., Halada P., Šimánek V.: *Drug. Metab. Dispos.*, in press.

## 29 MODULACE APOPTÓZY ZPROSTŘEDKOVANÉ Fas V BUNĚČNÝCH LINIÍCH MYELOIDNÍHO PŮVODU POMOCÍ DIMETHYLSULFOXIDU

JAN VONDRÁČEK<sup>a</sup>, MICHAEL A. SHEARD<sup>b</sup>,  
KATEŘINA MINKSOVÁ<sup>a</sup>, JIŘINA HOFMANOVÁ<sup>a</sup>  
a ALOIS KOZUBÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 312 65 Brno,

<sup>b</sup>Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Programovaná buněčná smrt (apoptóza) má zásadní význam jak pro vývoj organismu, tak pro udržení homeostasy<sup>1</sup>. Specifické buněčné receptory typu receptoru pro TNF, jako je například Fas, hrají významnou roli v tomto procesu<sup>2</sup>. Nedávno jsme prokázali, že apoptóza zprostředkovaná těmito receptory v buňkách lidské myeloidní leukémie HL-60 může být posílena aplikací dimethylsulfoxidu (DMSO). Zároveň bylo zjištěno, že DMSO zvyšuje expresi Fas na povrchu těchto buněk<sup>3</sup>. DMSO indukuje diferenciaci některých myeloidních linií do buněk zralějších stádií<sup>4</sup>. Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné prokázat tento jev také u dalších leukemických buněčných linií.

Buňky HL-60, U937, ML-1 a Jurkat byly pěstovány v médiu RPMI1640 s přísadkou 10 % fetálního telecího séra. Pro sledování apoptózy byly buňky vysety v hustotě  $2 \times 10^5$  buněk/ml a inkubovány s DMSO (1 %, v/v) a myší monoklonální protilátkou proti Fas (CH-11, 100 ng.ml<sup>-1</sup>).

Apoptóza byla detekována na základě morfologických kritérií a pomocí analýzy buněčného cyklu na průtokovém cytometru. Expres Fas byla detekována pomocí průtokového cytometru po obarvení buněk protilátkou UB2 (Immunotech).

DMSO významně zvyšoval expresi Fas po 48 h inkubace u všech testovaných buněčných linií v porovnání s kontrolou, s výjimkou linie ML-1. Aplikace DMSO zároveň zvýšila množství apoptických buněk U937 a Jurkat po 16 a zejména 40 h inkubace s protilátkou CH-11. Bylo potvrzeno, že u buněk HL-60 není apoptóza po aplikaci CH-11 pozorována, pokud není použito médium bez přísadky séra.

Bylo prokázáno, že DMSO může indukovat zvýšenou expresi Fas u některých buněčných linií. Je pravděpodobné, že určitou roli by zde mohl hrát protein p53, neboť buněčná linie ML-1, u níž nebyla pozorována zvýšená expres Fas, jako jediná exprimuje nemutovaný wt p53. Zároveň je zřejmé, že samotná expres Fas nemusí být zodpovědná za posílení apoptózy po kombinované aplikaci protilátky CH-11 a DMSO, neboť u buněk HL-60 sice došlo ke zvýšení expres Fas po aplikaci DMSO, ale apoptóza nebyla pozorována, pokud nebylo použito bezsérové médium. Objasnění mechanismů regulujících apoptózu jak v normálních, tak v maligních hemopoietických populacích, má význam pro vývoj nových terapeutických strategií pro léčbu leukemií. Použití diferenciačních

činidel jako je DMSO nebo retinoidů, které jsou již dnes používány při diferenciační terapii může zásadním způsobem ovlivnit reakci buněk na apoptické podněty, jakými jsou například aktivace receptorů TNF rodiny.

Autoři děkují za finanční podporu grantům GA ČR 312/98/P011 a 301/00/0563.

## LITERATURA

1. Steller H.: *Science* 267, 1445 (1995).
2. Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M. E.: *Eur. J. Biochem.* 254, 439 (1998).
3. Vondráček J., Sheard M. A., Minksová K., Hofmanová J., Kozubík A.: *J. Leukoc. Biol.*, submitted.
4. Collins S. J., Ruscetti F. W., Gallagher R. E., Gallo R. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2458 (1978).

## 30 DISTRIBUTION AND KINETICS OF EXOGENOUS BROMIDE IN THE RAT

STANISLAV PAVELKA<sup>a,b</sup>, ARNOŠT BABICKÝ<sup>c</sup>,  
MILOSLAV VOBECKÝ<sup>c</sup>, and JAROSLAV LENER<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, 611 37 Brno, <sup>b</sup>Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, <sup>c</sup>Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague 4, <sup>d</sup>Charles University, 3<sup>rd</sup> Medical Faculty, 110 00 Prague 10, Czech Republic

Bromide as the main degradation product of fumigants excessively used in horticulture (e.g. methylbromide) and other bromine compounds applied on a large scale in industry (e.g. 1,2-dibromoethane, hexabromobenzene, vinylbromide and other halogenated additives) contribute significantly to the contamination of the environment. The new role of bromide as a residue in food and water warranted its thorough toxicological evaluation<sup>1</sup>. Because of the chemical similarity of bromine to iodine, goitrogenic effects of bromide cannot be excluded<sup>2</sup>. Bromide has been found to be partitioned in the body similarly to chloride<sup>3</sup>, so that administration of bromide results in some displacement of body chloride and vice versa. However, in our recent article<sup>4</sup>, we described that at enhanced intake of bromide, bromine does not replace chlorine in the rat thyroid gland. In this organ, it replaces iodine. As shown in our subsequent article<sup>5</sup>, the biological half-life of bromine in the rat thyroid is significantly shorter than the whole-body biological half-life.

In the present study, the distribution of <sup>82</sup>Br-bromide in 15 various organs and tissues of rats has been determined by high-resolution gamma-ray spectrometry and by the scintillation counting technique at different times after the application of Na<sup>82</sup>Br, either by subcutaneous injection or by continuous administration in the drinking water. The use of a semiconductor detector allowing more sensitive measurement of samples of greater volume, including living animals, on the one hand, and the administration of labelled bromide in the food in addition to injection, on the other, enabled us to extend markedly the period of observation, to express the amount of

bromide retained in individual organs as well as in the whole body, and to make a total bromide balance. The amount of  $^{82}\text{Br}$ -bromide in different tissues reached its largest uptake within a few hours, and the concentration ratio of  $^{82}\text{Br}$  in the tissues to blood remained practically constant between 8 and 396 h after the application. The whole stomach of rats was the only organ of those investigated that had a larger uptake of  $^{82}\text{Br}$  than blood. Contrary to some previous findings, the concentration of radiobromide in the thyroid was found not to exceed that in the blood. A remarkably high concentration of  $^{82}\text{Br}$  was found in skin, which represented, because of its large mass, the most abundant depot of bromide in the body of rats. The demonstrated excretion of bromide was mainly renal, at a rate of approximately 5 % of the administered dose per 24 h.

Moreover, biological half-lives of bromine in these 15 various organs and tissues of rats, in addition to the whole-body half-life, were determined by measuring the radioactive concentration of  $^{82}\text{Br}$ -bromide in samples of tissues collected at the time intervals of 12–396 h from animals that continuously (up to 17 d) received  $^{82}\text{Br}$ -labelled bromide in their drinking water. The half-life values, calculated from the experimental data by the method of gradual estimates of the parameters in question with the SPSS statistical program, ranged from  $94.3 \pm 14.6$  h in the thyroid gland to  $235.0 \pm 88.9$  h in liver. In most of the studied tissues, the biological half-lives of bromine were shorter than in the whole body, in which it equalled  $197.8 \pm 22.2$  h. Significant correlation between the values of the steady-state concentration of bromide and of the biological half-life was found for most tissues (except for liver). The steady-state concentrations of  $^{82}\text{Br}$  in tissues are probably proportional to the magnitude of bromide space, and, consequently, of chloride space.

In conclusion, our results unambiguously prove that for the determination of the biological half-life of bromine (and, maybe, some other elements), one cannot use estimates in just one type of tissue (e.g., only in the blood plasma). It is not correct to speak about biological half-life of a substance without specifying the relevant organ or tissue.

*This work was supported by the grants from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (No.*

#### Tabuľka I

Účinnok dezinfekčných látok na *S. marcescens*

Skup.	Látka	MIC	ED <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> Ade	IC <sub>50</sub> Leu	R
			[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]		[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	
A	Benzalkonium chlorid	0,09–0,19	0,03	0,51	0,58	0,88
A	Neoquat S	0,19–0,39	0,05	2,19	2,82	0,79
A	Sokrena	0,39–0,78	0,12	2,51	4,47	0,56
A	Triquart	0,39–0,78	0,3	0,39	1,5	0,62
A	Hexaquart S	0,78–1,56	0,28	2,75	2,43	1,17
A	ADL 007	1,56–3,12	0,48	9,77	11,2	0,88
A	FD 312	1,56–3,12	0,56	7,76	8,71	0,89
B	Diesen forte	0,09–0,19	0,06	2,07	1,8	1,15
B	Divoquat forte	0,39–0,78	0,12	1,7	3,31	0,52
B	Hexaquart plus	0,39–0,78	0,2	0,81	1,17	0,69
B	ID 212	0,78–1,56	0,51	1,74	2,45	0,71
B	Microbac forte	1,56–3,12	0,89	5,25	6,31	0,83

*A7011813) and the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (No. NJ6109-3).*

#### REFERENCES

1. Rauws A. G.: Food Chem. Toxicol. 21, 379 (1983).
2. Vobecký M., Babický A., Lener J., Pavelka S.: Hygiena 42, 86 (1997).
3. Ullberg S., et al.: Biochem. Pharmacol. 13, 407 (1964).
4. Vobecký M., Babický A., Lener J., Švandová E.: Biol. Trace Elem. Res. 54, 207 (1996).
5. Vobecký M., Babický A., Lener J., Pavelka S.: Physiol. Res. 46, 385 (1997).

#### 31 ÚČINOK DEZINFEKČNÝCH LÁTOK NA RAST A METABOLIZMUS *SERRATIA MARCESCENS*

VIKTOR MAJTÁN

*Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbová 14, 833 01 Bratislava, Slovenská republika*

V súčasnosti zaznamenávame zvýšenie počtu kmeňov *S. marcescens*, ktoré sa podieľajú na vzniku a šírení nozokomiálnych nákaz, ktoré majú stúpajúcu tendenciu. Kmene *S. marcescens* vyvolávajúce uvedené nákazy sú často rezistentné na dezinfekčné látky a tiež na viaceré antibiotiká<sup>1</sup>. Kvartérne amóniové zlúčeniny (KAZ) patria k základným dezinficienciam už veľa rokov. KAZ predstavujú zlúčeniny s povrchovými, solubilizáčnymi a antimikrobiálnymi vlastnosťami. Sú to membránovo-aktívne zlúčeniny a ich väzba na cytoplazmatickú membránu predstavuje zásah do metabolizmu buniek. Pri rutinnom a extenzívnom používaní týchto látok sa zaznamenáva rezistencia viacerých mikroorganizmov.

Cieľom predloženej práce bolo posúdiť účinok dvanástich prevažne nových dezinfekčných látok – obsahujúcich KAZ (skupina A) a KAZ s inou zložkou (skupina B) na rast a metabolické procesy klinického izolátu *S. marcescens*.

Antimikrobiálna účinnosť bola charakterizovaná ovplyvnením rastu a rozmnožovania baktérií vyjadrená hodnotami

MIC a ED<sub>50</sub>. Metabolická aktivita bola hodnotená ovplyvnením biosyntetických procesov sledovaním inhibície inkorporácie [<sup>14</sup>C] adenínu a [<sup>14</sup>C] leucínu do príslušných makromolekúl a sledovaním endogénnej respirácie s využitím Clarkovej elektródy.

Výsledky v tabuľke I ukazujú na antibakteriálnu účinnosť testovaných dezinfekčných látok na *S. marcescens*. Najúčinnjšími látkami sú Benzalkonium chlorid a Diesen forte. Inhibičný účinok študovaných dezinficiencií je charakterizovaný hodnotami IC<sub>50</sub> (koncentrácia látky v mg.ml<sup>-1</sup> potrebná pre 50 % zníženie rýchlosti inkorporácie [<sup>14</sup>C] prekurzorov). Oveľa výhodnejším parametrom na vyjadrenie účinnosti sú hodnoty R – (IC<sub>50</sub>Ade: IC<sub>50</sub>Leu). Hodnoty R ≈ 1 študovaných látok ako sú Benzalkonium chlorid, Neoquat S, ADL007, FD312, Microbac forte, Diesen forte a Hexaquat S sú typické pre biolo-

gicky aktívne zlúčeniny interferujúce s celulárnym energetickým metabolizmom<sup>2</sup>. Benzalkonium chlorid a Diesen forte výrazne potlačili endogénnu respiráciu *S. marcescens* v koncentrácii 0,19 resp. 0,39 mg.ml<sup>-1</sup>.

Dosiahnuté výsledky ukazujú na vhodný prístup biochemického hodnotenia antibakteriálnej účinnosti a naznačujú aj mechanizmus účinku dezinfekčných látok.

#### LITERATÚRA

1. Hejazi A., Falkiner F. R.: J. Med. Microbiol. 46, 903 (1997).
2. Majtán V., Majtánová L.: Inter. J. Antimicrob. Agents 11, 59 (1999).



## 01 POČÍTAČOVÝ DESIGN DEHALOGENUJÍCÍCH ENZYMŮ

JIRÍ DAMBORSKÝ, JAN K MUNIČEK,  
MICHAL BOHÁČ, MARTIN PROKOP  
a JAROSLAV KOČA

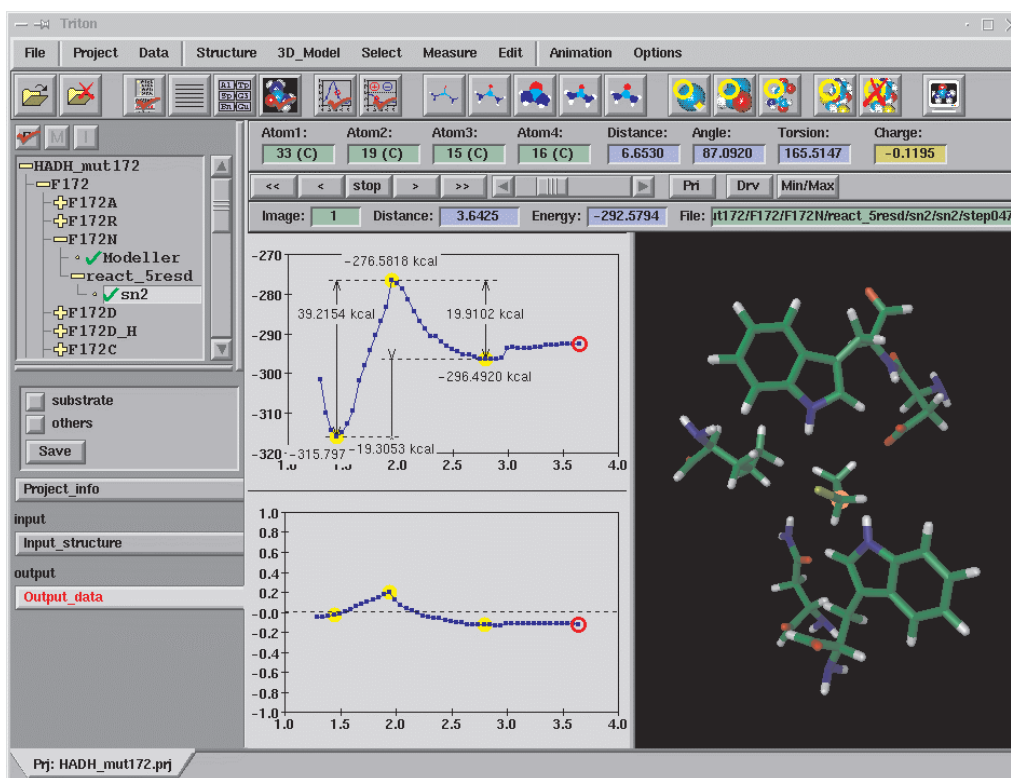
*Laboratoř struktury a dynamiky biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno*

Dehalogenasy jsou enzymy katalyzující štěpení kovalentní vazby uhlík–halogen. Mikrobiální dehalogenasy se významně podílejí na odbourávání halogenderivátů znečišťujících životní prostředí a nalézají využití v environmentálních biotechnologiích. Stávající katalytická aktivita a substrátová specifita některých dehalogenas je však pro praktické aplikace nevyhovující. Metody rekombinantní DNA umožňují experimentálně modifikovat strukturu proteinů a tím i jejich katalytické vlastnosti. Technicky dnes již není problém zkonstruovat mutantní protein, problematický však zůstává návrh mutací vedoucích k požadovaným změnám v aktivitě a specifitě. Cílem projektu je vývoj počítačových metod pro design mutantních proteinů a použití těchto metod pro modifikaci katalytických vlastností dehalogenas. V současné době vyvíjíme tři různé metody modelující aktivitu a/nebo specifitu enzymů: *i*) Quantitative Structure-Function Relationships<sup>1,2</sup> (QSFR), *ii*) počítačová místně-cílená mutagenese<sup>3</sup> a *iii*) Comparative Binding Energy Analysis<sup>4</sup> (COMBINE).

QSFR analýza myšlenkově vychází ze široce používané analýzy Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR). QSAR analýza se zabývá popisem vztahů mezi strukturou

a aktivitou malých molekul, zatímco QSFR analýza studuje vliv změn ve struktuře proteinu na jeho funkci. Strukturální a fyzikálně-chemické vlastnosti aminokyselin jsou statisticky korelovány s biologickými daty. QSFR analýza nevyžaduje znalost 3D struktury studovaného proteinu. QSFR analýza byla úspěšně použita pro studium vztahů mezi strukturou a katalytickou funkcí mutantních proteinů haloalkan dehalogenasy Dh1A a subtilisinu, a pro studium vztahů mezi strukturou a stabilitou mutantních proteinů lysozymu a tryptophan synthetasy<sup>2</sup>. Výsledkem analýz jsou regresní rovnice umožňující kvantitativní predikci aktivity a stability mutantních proteinů z fyzikálně-chemických vlastností substituovaných aminokyselin.

Počítačová místně-cílená mutagenese využívá počítačové modelování ke konstrukci 3D struktur mutantních proteinů. Připravené struktury jsou použity pro modelování průběhu reakce umožňující studium vlivu mutace na katalytickou aktivitu enzymu. Mutantní proteiny jsou konstruovány metodou homologního modelování<sup>5</sup> s využitím experimentálně určené struktury divokého typu jako vzoru. Průběh reakce je modelován metodami kvantové mechaniky<sup>6</sup>. Do výpočtu je zahrnuto aktivní místo enzymu a molekula substrátu. Struktura enzymu s navázaným substrátem je buď známa z krystalografické analýzy, nebo je připravena molekulovým dokováním s následnou minimalizací molekulovou mechanikou. Počítačová místně-cílená mutagenese byla poprvé použita k bodové substituci v pozici 172 haloalkan dehalogenasy Dh1A (cit.<sup>3</sup>). Byl studován vliv substituce aminokyseliny aktivního centra na stabilizaci tranzitního stavu a produktů dehalogenační reakce. Výpočty prokázaly, že pouze aminokyseliny s bočním řetězcem umožňujícím stabilizaci jednoho z produktů reakce (ha-



Obr. 1. Grafický interface programu TRITON pro počítačovou mutagenezi

logenidového iontu), mohou substituovat Phe172 divokého typu za současného zachování aktivity enzymu. Porovnání s experimentem potvrdilo schopnost počítačové mutagenese odlišit aktivní mutanty od mutantů neaktivních. Implementace počítačové místně-cílené mutagenese do grafického programu TRITON (obr. 1) umožnilo její automatizaci, nezbytnou pro rychlé modelování mutantních proteinů a efektivní studium průběhů biochemických reakcí<sup>7</sup>. Program TRITON je poskytován akademickým uživatelům zdarma na adrese <http://www.chemi.muni.cz/lbsd/triton.html>.

COMBINE analýza kvantitativně hodnotí energetické příspěvky jednotlivých aminokyselinových zbytků proteinu k celkové vazebné energii ligandu navázaném v aktivním centru proteinu. COMBINE analýza byla původně vyvinuta pro návrh inhibitorů v oblasti designu léčiv<sup>4</sup>. Testování možnosti použití COMBINE analýzy k designu proteinů je předmětem našeho výzkumu. Molekulovou mechanikou bylo zkonstruováno 16 enzym-substrát komplexů haloalkan dehalogenasy DhIA. Statistickou analýzou interakčních energií byly identifikovány aminokyselinové zbytky určující specifitu enzymu van der Waalovými interakcemi (Phe172, Trp175 a Pro223) a elektrostatickými interakcemi (Gly55 a molekula H<sub>2</sub>O). Mutace těchto aminokyselin by měly vést ke změnám ve specifitě dehalogenasy DhIA.

*Tato práce byla podpořena granty GA ČR 203/97/P149 a MŠMT ME276.*

#### LITERATURA

1. Damborský J.: Quant. Struct.-Act. Relat. 16, 126 (1997).
2. Damborský J.: Prot. Eng. 11, 21 (1998).
3. Damborský J., Boháč M., Prokop M., Kutý M., Koča J.: Prot. Engng. 11, 901 (1998).
4. Ortiz A. R., Pisabarro M. T., Gago F., Wade R. C.: J. Med. Chem. 38, 2681 (1995).
5. Sali A., Blundell T. L.: J. Mol. Biol. 234, 779 (1993).
6. Damborský J., Kutý M., Němec M., Koča J.: J. Chem. Inf. Comp. Sci. 37, 562 (1997).
7. Prokop M., Damborský J., Koča J.: Bioinformatics, v tisku.

## 02 PLANTS AS A TOOL FOR REMOVAL OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS

PETRA KUČEROVÁ<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>,  
TOMÁŠ MACEK<sup>b</sup>, LUDMILA CHROMÁ<sup>a</sup>,  
JIŘÍ BURKHARD<sup>c</sup>, JAN TRÍSKA<sup>d</sup>,  
and KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, ICT Prague, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>b</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague, <sup>c</sup>Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemical Technology, ICT Prague, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>d</sup>Institute of Landscape Ecology, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Recently it was shown that plants have high capacity to remove organic and inorganic pollutants from the environment. The ability of cell cultures of various plant species

cultivated *in vitro* to degrade and detoxify PCBs has been recently studied in detail<sup>1,2</sup>. For the evaluation of PCB conversion Delor 103 – a PCB mixture formerly commercially produced in Czechoslovakia containing congeners with a different degree of chlorination was used. PCBs were added in methanol solution (1 ml) to give an initial PCB concentration of 2.5–5 mg in 100 ml of nutrient medium (25, 50 ppm). Individual congeners of monochlorobiphenyls were used in concentrations 30 ppm and 3 ppm. Residual content of PCBs was measured by GC using the analytical procedure optimised by Burkhard et al.<sup>3</sup> About 40 axenic cell cultures of different plant species were screened for the ability to transform PCBs. This ability was evaluated in relation to the origin and morphology of the cultures tested. Results showed a great variability in the capability to convert PCBs within different cultures of the same plant species. The best results were obtained with *Solanum nigrum* (black nightshade) hairy root clone SNC-90 obtained after transformation of plant cells by *Agrobacterium rhizogenes*. *S. nigrum* was used for studying of metabolism of individual congeners of all three monochlorobiphenyls and selected dichlorobiphenyls with the aim to estimate structure of formed products. Various monohydroxylated and dihydroxylated chlorobiphenyls were detected. As the major products 4-hydroxy chloroderivatives were identified. Removal of PCBs was tested also at real conditions in contaminated soil. Significant decrease of PCBs (20–30 %) was detected after 7 month in soil vegetated with *S. nigrum* and *N. tabacum*.

*The project was sponsored by the grant of the Grant Agency of the Czech Republic No. 203/99/1628 and the Grant Agency of CAS No. B6127901.*

#### REFERENCES

1. Macková M., Macek T., Burkhard J., Očenášková J., Demnerová K., Pazlarová J.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 39, 317 (1997).
2. Macek T., Macková M., Burkhard J., Demnerová K., in: *Effluents from Alternative Demilitarization Technologies* (Holm F. W., ed.), p. 71. Kluwer Academic Publishers, 1998.
3. Burkhard J., Macková M., Macek T., Kučerová P., Demnerová K.: Anal. Commun. Royal. Soc. 34, 287 (1997).

## 03 THE ROLE OF PLANT ENZYME SYSTEMS IN TRANSFORMATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS

LUDMILA CHROMÁ<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>,  
PETRA KUČEROVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ BURKHARD<sup>b</sup>,  
and TOMÁŠ MACEK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, ICT Prague, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>b</sup>Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemical Technology, ICT Prague, Technická 5, 166 28 Prague, <sup>c</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Science of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague, Czech Republic

Recently plants have shown to be able to transform polychlorinated biphenyls (PCBs)<sup>1,2</sup>. The knowledge about meta-

bolism and enzymes involved in this process is limited. Plant peroxidases (POX) generally play an important role in plant metabolism. In our work we screened several *in vitro* cultures of different plant species for their ability to transform PCBs and compared it with the level of total extra- and intracellular peroxidase activity<sup>3,4</sup>. Cultures with good transformation ability exhibited in the presence of PCBs the same or higher levels of POX than controls incubated without PCBs. Cultures with markedly lower POX activity exhibited in the presence of PCBs also lower PCB conversion. We attempted to identify lignin peroxidase and Mn-peroxidase in plants, originally described in white rot fungi to be responsible for the degradation of PCBs and other environmental pollutants. Except different types of POX also RBBR oxidase (Remazol Brilliant Blue R decolourising enzyme) was detected in plants. The decolourisation of RBBR during the growth on agar plate was used as a rough screening method for plant cell cultures able to efficiently metabolise PCBs. The role of POX and cytochrom P450 in PCB transformation was followed using inhibitors and inducers of these enzymes. In all cases of used inhibitors (propylgallate, benzoate, metyrapon, aminobenzotriazol) a decrease of PCB conversion was estimated. On the other hand some inducers of cytochrome P450 positively influenced PCB transformation. These preliminary results show the involvement of both enzymatic systems in the detoxification reaction of PCBs in plants.

*This work was supported by grant No 203/99/1628 of the Grant Agency of the Czech Republic.*

#### REFERENCES

1. Kučerová P., Poláková L., Macek T., Pazlarová J., Demnerová K., Macková M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 250 (1998).
2. Macková M., Macek T., Kučerová P., Burkhard J., Pazlarová J., Demnerová K.: *Biotechnol. Lett.* 19, 787 (1997).
3. Kučerová P., Macková M., Poláková L., Burkhard J., Demnerová K., Macek T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1497 (1999).
4. Kučerová P., Poláková L., Macek T., Burkhard J., Tríska J., Macková M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 249 (1998).

#### 04 BACTERIAL PCB DEGRADATION INDUCED BY NATURAL COMPOUNDS OF PLANT ORIGIN

MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>, TOMÁŠ MACEK<sup>c</sup>,  
LUDMILA CHROMÁ<sup>a</sup>, PETRA KUČEROVÁ<sup>a</sup>,  
JIŘÍ BURKHARD<sup>a</sup>, JAN TRÍSKA<sup>b</sup>,  
NADĚŽDA VRCHOTOVÁ<sup>b</sup>, HANA NOVÁKOVÁ<sup>a</sup>,  
and KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology., ICT Prague, Technická 3, 166 28 Prague, <sup>b</sup>Institute of Landscape Ecology CAS, Branišovská ul. 31, 370 05 České Budějovice, <sup>c</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague, Czech Republic

Plants transform organic pollutants to non-phytotoxic compounds which can be deposited in plant body or further relea-

sed into soil. These compounds can be metabolised by different organisms present in the environment. In nature bacteria co-exist with plants especially in the plant root zone. In rhizosphere and rhizoplane the total amount of micro-organisms is much higher than in bulk soil. Compounds present in root exudates<sup>1</sup> may serve as natural substrates for the growth and for induction of the genes of the biodegradative pathway. In laboratory experiments biphenyl serves as an inducer of PCB degradative pathway and as co-substrate.

Analysis of the samples of contaminated soil showed that in rhizosphere and rhizoplane of vegetated plants the amount of bacteria is 10–100 times higher than in bulk soil. Isolated bacteria were taxonomically characterised (mostly genera *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes* etc.) and their ability to transform PCBs was evaluated in the presence of biphenyl. Bacteria with good degradation abilities were screened for their ability to grow in the presence of some plant compounds (vanillic, ferulic acids, limonene, quercetin etc.) as the sole carbon source. Compounds which have supported good growth were tested also as natural co-substrates for induction of the PCB degradative pathway. Good growth and PCB degradation was achieved in the case of quercetin, ferulic acid and vanillic acid. To evaluate the role of plants, production of root exudates by the hairy root culture *Solanum nigrum* and their composition was studied. Presence of vanillic and ferulic acids was proved. Hydrolysed and non-hydrolysed extracts of phenols isolated from medium and cells after cultivation of *S. nigrum* were added to the bacterial cultivation medium as the sole source of carbon. Compounds present in extracts enhanced bacterial growth and supported PCB mineralising ability of bacteria.

*The work was supported by the grant No. B6127901 of the Grant Agency of the CAS and research project of the DFG No. 436TSE113/35/0.*

#### REFERENCES

1. Fletcher J. S., Donnelly P. K., Hegde R. S., in: *Bioremediation of Recalcitrant Organics* (Hinchee R. E., Anderson D. B., Hoepfel R. E., ed.), p. 131. Battelle Press, Columbus, 1995.

#### 05 VLIV VYBRANÝCH ORGANICKÝCH KYSELIN NA BIODEGRADACI PCB

MILUŠE VOŠAHLÍKOVÁ<sup>a</sup>, JARMILA PAZLAROVÁ<sup>a</sup>,  
MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ BURKHARD<sup>b</sup>,  
KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>a</sup> a HANA NOVÁKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, <sup>b</sup>Ústav technologie ochrany životního prostředí, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28, Praha 6

Polychlorované bifenyly (PCB) patří mezi xenobiotika ohrožující životní prostředí. Jejich produkce započala na konci 30-tých let. Přípravovaly se přímou chlorací bifenylového jádra za přítomnosti železitých iontů. Pro své vynikající fyzikální a chemické vlastnosti našly uplatnění v řadě průmyslových odvětví. Ve světě byly prodávány pod různými názvy

(KANECLOR-Japonsko, DELOR 103-ČSSR, atd.). Tyto přípravky tvořily směsi PCB v různém stupni chlorace, většinou obsahovaly 50–60 izomerů. Po 40-ti letech byl prokázán jejich negativní účinek na živočišný organismus a jejich produkce byla zastavena, přesto se za dobu jejich výroby připravilo tisíce tun, které zatěžují životní prostředí. Jednou z metod jejich odstranění je využití degradační schopnosti některých půdních mikroorganismů.

Tato práce navazuje na předcházející studie a rozšiřuje je o působení aminokyselin, chlorbenzoových a huminových kyselin na růst a degradaci PCB-degradujícího kmene *Pseudomonas putida*/2 (cit.<sup>1</sup>).

Test PCB-degradačních schopností zahrnoval 14-ti denní kultivaci s Delorem 103 (0,05 g.l<sup>-1</sup>), bifenylem (BP) (5 g.l<sup>-1</sup>) a příslušnou testovanou látkou, ohřev na vodní lázni při 90 °C, 15-ti minutovou sonikaci a extrakci hexanem. K vyhodnocení degradace PCB byla použita metoda plynové chromatografie s externím standardem (plynový chromatograf HP 5890 s integrátorem HP 3392A), při které bylo sledováno 22 vrcholů<sup>2</sup>. Působení jednotlivých kyselin na růst bakteriálního kmene bylo sledováno měřením OD při 650 nm.

Ze směsi chlorbenzoových kyselin byla vybrána 2,5-dichlorbenzoová kyselina (CBA), která byla zjištěna ve vysoké koncentraci při analýze produktů po biodegradaci PCB (cit.<sup>3</sup>). Z huminových kyselin (HK) byly použity dva typy. Při testování aminokyselin (AK) byla použita komerčně dodávaná směs Vitamin-free casamino acids.

Tabulka I

Vliv různé koncentrace 2,5-dichlorbenzoové kyseliny na růst *P. putida*/2 a biodegradaci Deloru 103

CBA ppm	BF	5	50	500	1000	2000
lag [hod]	15	20	20	20	20	25
m [hod <sup>-1</sup> ]	0,042	0,046	0,041	0,009	0,013	0,014
T [hod]	15	15	16,8	21,5	50	50
max OD	5,1	4,8	3,7	3,3	3,1	2,8
degradace [%]	61,44	–	58,52	68,32	63,64	54,19

Z dosažených výsledků vyplývá, že CBA neinhibuje růst bakteriálního kmene při koncentraci 5 ppm a biodegradaci naopak mírně stimuluje ve všech sledovaných koncentracích (50, 500, 1000 a 2000 ppm) (tab. I). Aminokyseliny v koncentracích 0,1 % a 0,05 % biodegradaci mírně podporují. Huminové kyseliny neovlivňují růst sledovaného kmene a zároveň nepůsobí jako zdroj uhlíku. Biodegradace PCB v přítomnosti

AK a HK je při koncentraci 0,4 g.l<sup>-1</sup> stimulovaná a při koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup> je mírně potlačena. K ověření účinku HK na biodegradaci PCB byl také užít kmen *Ralstonia eutropha* H850. Účinek na oba kmeny byl srovnatelný.

Tato práce byla prováděna s podporou výzkumného projektu: J19/98:2232500003.

## LITERATURA

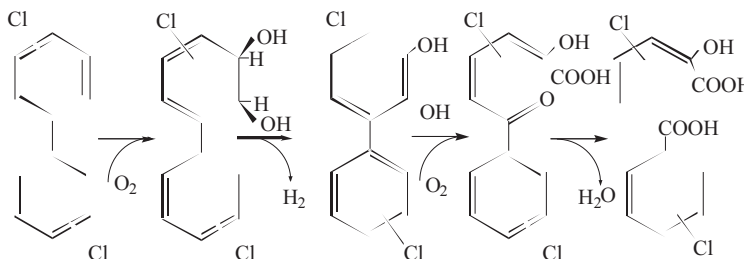
1. Pazlarová J., Demnerová K., Macková M., Šiková H.: *ECB9 Proceedings on CD-ROM ISBN 805215-1-5* © 1999–2000 Branche Belge de la Société de Chimie Industrielle.
2. Burkhard J., Poláková B., Demnerová K., Pazlarová J.: *Fresenius Environ. Bull.* 5, 392 (1996).
3. Šiková H.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1998.

06 METABOLISMUS PCB U KMENE *PSEUDOMONAS PUTIDA*/2

HANA NOVÁKOVÁ<sup>a</sup>, MILUŠE VOŠAHLÍKOVÁ<sup>a</sup>, JARMILOVA PAZLAROVÁ<sup>a</sup>, KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup> a JIŘÍ BURKHARD<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, <sup>b</sup>Ústav technologie ochrany životního prostředí, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Rozvoj vědy a techniky v našem století s sebou přinesl i řadu negativních jevů. Jedním z nejvýznamnějších je soustavné znečišťování životního prostředí. Nové technologie a výrobní procesy vyžadují stále nové a nové materiály a sloučeniny se zdokonalenými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Do prostředí se tak mohou dostat látky, s nimiž organismy v průběhu evoluce dosud nepřišly do styku, tzv. xenobiotika. Mezi jedny z nejrozšířenějších patří v současné době i polychlorované bifenyle (PCB). Díky svým vynikajícím fyzikálním a chemickým vlastnostem mezi které patří zejména nízká rozpustnost ve vodě, inertnost, odolnost vůči účinkům kyselin a zásad, omezená hořlavost, tepelná stabilita a vysoký elektrický odpor, našly směsi PCB široké uplatnění v řadě průmyslových odvětvích (transformátorové oleje, pesticidy, složky barviv, aj.). Vzhledem k současným poznatkům o toxicitě, možné karcinogenitě a teratogenitě PCB je jejich odstranění z životního prostředí velmi aktuálním problémem. Vedle poměrně náročné degradace fyzikálně-chemickými metodami se jako efektivní řešení jak z hlediska ekonomického tak eko-



Obr. 1. Metabolická dráha odbourávání PCB



logického nabízí využití mikroorganismů, zejména některých půdních bakterií. Aerobní degradace PCB probíhá čtyřstupňovým procesem (obr. 1): oxidace bifenyl-dioxygenasou, následná dehydrogenace, *meta*-štěpení v polohách 1,2. Konečným produktem je pak chlorbenzoová kyselina a kyselina 2-hydroxy-2,4-pentadienová.

Tato práce se věnuje studiu degradačních vlastností bakteriálního kmene *Pseudomonas putida*/2, který byl izolován z kontaminované zeminy. Zůstatek po degradaci komerční směsi PCB, Deloru 103 (průměrný stupeň chlorace: 3 a více atomů Cl na molekulu bifenylu), byl měřen metodou plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Za standardních podmínek v minimálním mediu s bifenylem jako jediným zdrojem uhlíku činil po dvou týdnech zůstatek Deloru 103 30–40 % z původního množství. V tekutém mediu byly pomocí GC detekovány jako produkty biodegradace Deloru 103 mono- a dichlorbenzoové kyseliny.

Pro stanovení typu přítomné bifenyl-dioxygenasy (2,3 nebo 3,4) byla provedena degradace čistých kongenerů 2,5,2',5'-tetrachlorbifenylu (IUPAC 52) se zablockovanými polohami pro 2,3-bifenyl-dioxygenasu a 3,4,3',4'-tetrachlorbifenylu (IUPAC 77) se zablockovanými polohami pro 3,4-bifenyl-dioxygenasu. U sledovaného kmene *P. putida*/2 byla zjištěna degradace obou kongenerů a tím potvrzena široká substrátová specifita degradačního systému.

Tato práce je podporována výzkumným projektem č. J19/98: 2232500003.

## LITERATURA

1. Abramowitz D. A.: CRC Crit. Rev. Biotechnol. 10, 241 (1990).
2. Furukawa K., Matsumura F., Tonomura K.: Agric. Biol. Chem. 42, 543 (1978).
3. Pazlarová J., Demnerová K., Macková M., Burkhard J.: Lett. Appl. Microbiol. 24, 334 (1997).

## 07 PŘÍPRAVA TRANSGENNÍCH ORGANISMŮ S MIKROBIÁLNÍMI GENY PRO DEGRADACI PCB

KATEŘINA FRANČOVÁ<sup>a</sup>, RADEK BOROVKA<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup> a TOMÁŠ MACEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha

V poslední době metody biologického odstraňování xenobiotik ze životního prostředí nahrazují složitě a ekonomicky náročné fyzikálně-chemické postupy. Kromě indigenních organismů se jako velmi výhodné jeví i využití transgenních jedinců slučujících několik potřebných vlastností dohromady<sup>1</sup>. Studium bakteriálního metabolismu ukázalo, že geny kódující enzymy jednotlivých metabolických drah degradace PCB nejsou přítomny v jednom mikroorganismu<sup>2</sup>. Proto na základě znalostí degradačních drah PCB u bakterií a metod genového inženýrství je snaha o vytvoření nových transgenních jedinců. Vzhledem k tomu, že transgenní rostliny jsou širokou veřejností lépe akceptovány než bakterie je výzkum

cílen na zavedení genů zodpovědných za syntézu enzymů degradační dráhy do rostlin<sup>3</sup>.

Cílem této práce bylo zvýšit účinnost degradace PCB úpravou genetického vybavení rostlin. Z bakteriální degradační dráhy byl vybrán gen *bphC* zodpovědný za syntézu enzymu 2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasy. Tento enzym katalyzuje *meta*-1,2 štěpení bifenylového kruhu, což je krok, který je z hlediska rostlinného metabolismu největší překážkou rozkladu PCB (cit.<sup>4</sup>). Tento enzym byl původně izolován z bakterie *Comamonas testosteroni* B-356, byla určena jeho kvarterní struktura a vlastnosti. Tento gen jsme obdrželi jako Sac I a Kpn I fragment vložený v plazmidu *pQE31*, který má 3462 párů bází. DNA byla amplifikována pomocí PCR a vložena do plazmidu *pBluescript II SK (-)* (*pSK*). Vytvořený konstrukt *pSK/bphC* byl sekvenován a byla ověřena primární struktura inzertu. Poté byl vybrán vektor *pBI121* s promotorem viru kvěťákové mozaiky CaMV 35S určený pro přenos *bphC* do rostlin. Plazmid *pBI121/bphC* v bakterii *A. tumefaciens* LBA 4404 byl transformací přenesen do modelové rostliny *Nicotiana tabacum*. Exprese genu *bphC* byla předem ověřována v bakteriích. Byla studována metodika izolace enzymu a purifikace pomocí afinitní chromatografie. V závěrečné fázi byla stanovována aktivita enzymu s 3-methylcatecholem, který může nahradit přirozený substrát 2,3-dihydroxybifenyl.

Tato práce byla sponzorována výzkumným projektem J19/98: 2232500003.

## LITERATURA

1. Totevová S., Prouza M., Brenner V., Demnerová K.: Chem. Listy 91, 858 (1997).
2. Totevová S., Prouza M., Brenner V., Demnerová K.: Chem. Listy 92, 312 (1998).
3. Ahmad D. Masse R., Sylvestre M.: Gene 86, 53 (1990).
4. Macková M., Macek T., Očenášková J., Burkhard J., Demnerová K., Pazlarová J.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 39, 319 (1997).

## 08 MICROBIAL DEGRADATION OF HYDROCARBON IN RELATION TO NUTRIENTS

JANA GODOČÍKOVÁ, LUDMILA KRUPANSKÁ, VIERA BOHÁČOVÁ, and BYSTRÍK POLEK

Institute of Microbiology, Slovak Academy of Sciences, Štefánikova 3, 814 34 Bratislava, Slovak Republic

The biological treatment processes currently play a major role in preventing and reducing the extent of organic environmental contamination. Bioremediation treatment technologies help to solve the problems of environment pollution. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) demands microorganisms with considerable metabolic diversity, and to achieve overall biodegradation, usually a consortium of different organisms with complementary metabolic capabilities may be needed. Naphthalene and their methyl-derivates are the most simple and ubiquitous of PAH in the environment. They are one of the most toxic components of crude oil due to

relatively high solubility in water. Screening and physiological testing of such microorganisms (degraders) represents an important part by the development of bioremediation technologies.

Naphthalene degrading mixed culture (*Pseudomonas putida*, *Staphylococcus* sp., *Klebsiella planticola*, *Stenothrophomonas maltophilia*) was isolated from a soil permanently contaminated by crude oil. Enrichment culture contained naphthalene (10 g.l<sup>-1</sup>) as a sole source of carbon and energy. Utilisation of naphthalene by microorganisms was confirmed by increasing amount of cell protein and viable cell counts. The stationary phase of the growth was achieved during the first day of cultivation. The growth of a microbial consortium was stimulated by increasing concentration of naphthalene in medium up to 3.3 g.l<sup>-1</sup>. Biodegradation capacity of a microbial consortium was preserved when the growth in mineral medium containing naphthalene was alternated with the growth on rich MPB medium without toxic substrate. In most cases mineral nutrient (N, P) supplementation significantly increases hydrocarbon degradation rates<sup>1,2</sup>.

The capacity of biodegradation was tested in five different media with regard to requirement of inorganic nutrients (N, P, S and trace elements) and in C-containing acetate medium. The best growth of a microbial consortium at concentration (3.3 g.l<sup>-1</sup>) was observed in medium with relatively high content of N (1.4 g.l<sup>-1</sup>). In any cases, the positive correlation between biodegradation rate and content of important elements P or S in the utilized media has not been confirmed. Phosphate rich medium rather inhibited the growth of microorganisms. Low yield of biomass in C-containing acetate medium was unexpected. Characteristics of growth curves in the same media were changed when microorganisms grew on significantly lower concentration of naphthalene (0.1 g.l<sup>-1</sup>).

The laboratory results suggest how the biodegradation efficiency could be effected in bioremediation treatment technologies.

This work was supported by VEGA grant No. 1/6099/99.

## REFERENCES

1. Leahy J. G., Colwell R. R.: *Microbiol. Rev.* 54, 305 (1990).
2. Collier E., in: *Methods in Biotechnology, Vol. 2: Bioremediation Protocols* (Sheenan D., ed.), p. 3. Humana Press Inc., Totowa 1997.

## 09 STUDIUM FYZIOLOGICKÉ ADAPTACE KVASINKY *CANDIDA MALTOSE* VŮČI *p*-KRESOLU

MARTINA SIGLOVÁ, MARTIN VESELÝ,  
ALENA ČEJKOVÁ, JAN MASÁK a VLADIMÍR JIRKŮ

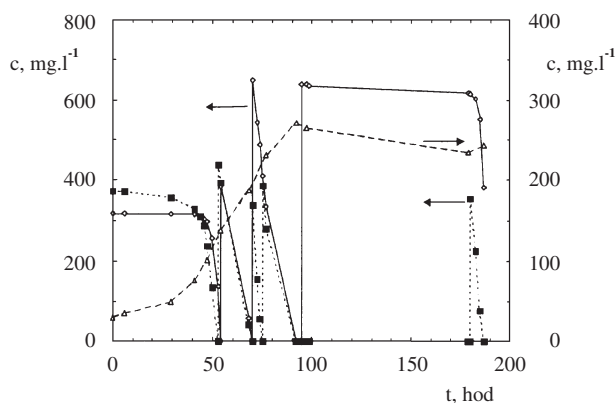
Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT, Technická 5,  
166 28 Praha 6

Aromatické sloučeniny jsou součástí řady přirozených materiálů. Benzenové jádro je zcela běžná struktura v přírodních látkách, kterou jsou organismy schopné štěpit. Na druhé straně patří aromatické látky mezi významné toxikanty pro

středí, což je způsobeno zavedením různých substituentů do aromatického jádra. Dochází tak ke snížení reaktivity rezonanční struktury jádra vůči kyslíku a struktura je tak mnohem odolnější proti otevření kruhu<sup>1</sup>.

Používaná kvasinková kultura *Candida maltosa* je půdní izolát z lokality dlouhodobě kontaminované fenolickými látkami<sup>2</sup>. Buněčný růst a testování stupně adaptace na původní substrát (fenol) bylo podrobně monitorováno díky mikrokultivačnímu zařízení Bioscreen C (Labsystem Oy, Finsko) ve dvou typech médií – Olson Johnsonově médiu<sup>3</sup> a YNB médiu (Difco Laboratories, USA). Koncentrace fenolu v médiu byla stanovována kolorimetricky užitím 4-amino-antipyrinové metody<sup>4</sup>. Koncentrace *p*-kresolu byla měřena pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (Watrex 4100, Thermo Separation Products, USA). Kvantifikace růstu testované populace byla prováděna monitorováním koncentrace proteinů podle Bradfordové<sup>5</sup>. Reaktorové fed-batch kultivace probíhaly v bioreaktoru (Braun Biotech International, Německo) o pracovním objemu 2,0 l při teplotě 28 °C a pH 5. Pro realizaci kontinuální kultivace byla použita skleněná náplňová kolona s pracovním objemem 148 ml s biofilmem kvasinky *C. maltosa*. Jako nosič byl využit keramický materiál Keramzit (Agro CS, ČR).

V první fázi experimentů byl zjišťován dosažený stupeň adaptace na fenol a vliv složení jednotlivých médií na biodegradaci. Vzhledem k bohatému nutričnímu zastoupení bylo z dalších pokusů vyřazeno Olsonovo-Johnsonovo médium a v YNB médiu byla ověřena inhibiční koncentrace fenolu pohybuující se okolo 2,0 g.l<sup>-1</sup>. V průběhu testování stupně adaptace kvasinky *C. maltosa* na *p*-kresol, došlo ke zjištění, že bez přítomnosti vhodného kosubstrátu biodegradace neprobíhá a dochází k zastavení růstu populace. V případě použití fenolu jako kosubstrátu (0,4 g.l<sup>-1</sup>) dochází jak k výraznému nárůstu, tak i k odbourávání obou sledovaných látek, v případě, že koncentrace *p*-kresolu výrazně nepřekročila 0,4 g.l<sup>-1</sup>. V průběhu dlouhodobější kontinuální kultivace bylo zjištěno, že biodegradace *p*-kresolu probíhá až do koncentrace 0,6 g.l<sup>-1</sup> při koncentraci fenolu 0,1 g.l<sup>-1</sup>. V závěrečné fázi pokusů byla provedena 7 denní kultivace v laboratorním fermentoru, při níž bylo zjištěno, že koncentrace *p*-kresolu 0,6 g.l<sup>-1</sup> v kombinaci s fenolem o koncentraci 0,4 g.l<sup>-1</sup> nevykazuje ještě inhibiční účinky (obr. 1). V nepřítomnosti fenolu biodegradace



Obr. 1. Kultivace kvasinky *C. maltosa* v laboratorním fermentoru, --- koncentrace bílkovin, — koncentrace *p*-kresolu, - - - koncentrace fenolu

*p*-kresolu neprobíhá a to ve všech sledovaných experimentálních uspořádáních. Předmětem dalších experimentů je proto ověření faktu, zda-li fenol působí jako účinný efektor při indukcii enzymů štěpících aromatické jádro, které by mohly být následně využívány při biodegradaci *p*-kresolu, zatímco *p*-kresol nedokáže syntézu těchto enzymů vyvolat.

## LITERATURA

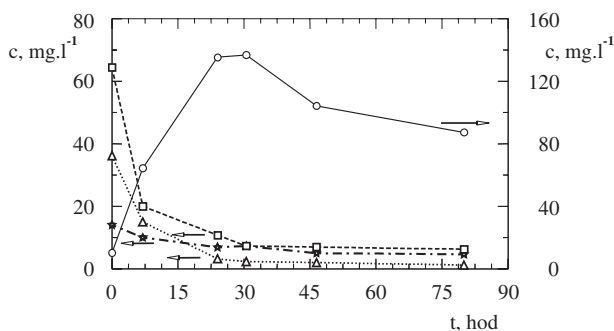
1. Masák J., Pelechová J., Plachý J.: *Speciální mikrobiální technologie*. VŠCHT, Praha 1992.
2. Masák J., Čejková A., Jirků V.: *J. Microbiol. Methods* 30, 133 (1997).
3. Olson B. H., Johnson M. J.: *J. Bacteriol.* 57, 235 (1949).
4. Martin R. W.: *Nature* 21, 1419 (1949).
5. Bradford M. A.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1972).

## 10 BIODEGRADACE BENZOÁTU A JEHO CHLORDERIVÁTŮ RODEM RHODOCOCCUS

VERONIKA MYLEROVÁ, ALENA ČEJKOVÁ,  
JAN MASÁK, VLADIMÍR JIRKŮ a ROMAN STRNAD

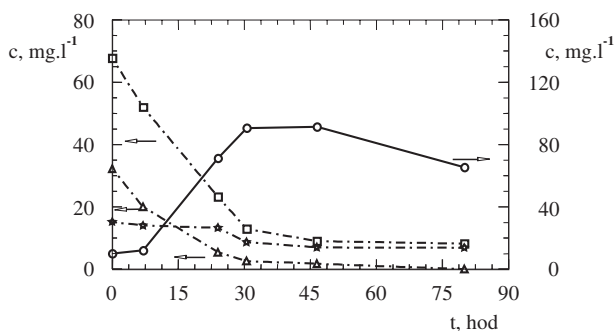
Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT, Technická 5,  
166 28 Praha 6

Chlorbenzoáty představují skupinu toxických látek, které se dostávají do životního prostředí především v podobě herbicidů (2,3,6-trichlorbenzoát) nebo částečným rozkladem poly-



Obr. 1. Kultivace kmene CCM 2881

□ koncentrace kyseliny benzoové, Δ koncentrace kyseliny 3-chlorbenzoové, ○ koncentrace bílkovin, ★ koncentrace kyseliny 4-chlorbenzoové



Obr. 2. Kultivace kmene CCM 29595

chlorovaných bifenylů (PCB). Většina dosud popsáných PCB-degradujících kmenů tvoří chlorbenzoáty jako koncové produkty degradace PCB, neboť nejsou schopny dalšího růstu na těchto substrátech<sup>1</sup>. Jednou z možností odstranění chlorbenzoových kyselin z prostředí je jejich mikrobiální degradace pomocí selektovaných adaptovaných mikroorganismů.

U vybraných kmenů *Rhodococcus* sp. CCM 2881 a *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595, pocházejících z České sbírky mikroorganismů, byla ověřena utilizace benzoátu a jeho chlorderivátů (2-chlorbenzoát, 3-chlorbenzoát a 4-chlorbenzoát), (Fluka, Germany), jako jediného zdroje uhlíku a energie. Kyselina benzoová byla přítomna v médiu buď jako jediný zdroj uhlíku a energie anebo v kombinaci s některým z výše uvedených chlorbenzoátů. Kultivace byly prováděny v Erlenmayerových baňkách umístěných na třepačkách při laboratorní teplotě. Jako kultivační médium, bylo použito základní minimální médium (BSM). Schopnost utilizace daných polutantů výše uvedenými bakteriálními populacemi byla stanovena na základě úbytku polutantu metodou kapalinové chromatografie<sup>2</sup>. Paralelně byla měřena koncentrace buněčných proteinů<sup>3</sup>.

Výše uvedené bakteriální populace byly schopny utilizace daných polutantů a to jak v případě, kdy byly přítomny samostatně (neznázorněno), tak i v případě kdy byly přítomny ve směsi s ostatními testovanými substráty (obr. 1, obr. 2).

## LITERATURA

1. Vrana B., Dercová K., Baláz Š.: *Chem. Listy* 89, 556 (1995).
2. Dietz E.A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 3331 (1993).
3. Bradford M. A.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1972).

## 11 KINETIKA OXIDACE FENOLU POPULACÍ KVASINEK CANDIDA TROPICALIS

JAN PÁCA a ELIŠKA KOMÁRKOVÁ

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6

Práce se zabývá ověřením vlivu rychlosti dodávky kyslíku a přítomnosti či absence esenciálních živin na rychlost degradace fenolu a na rychlost spotřeby kyslíku. Pokusy byly provedeny s kvasinkou *Candida tropicalis* izolovanou ze zeminy dlouhodobě kontaminované aromatickými uhlovodíky. Tato kvasinka je schopna růstu na fenolu jako jediném zdroji uhlíku a energie za aerobních podmínek.

Výsledky prokázaly, že rychlost oxidace fenolu v kvasinkových buňkách je přímo úměrná rychlosti spotřeby kyslíku. Nejsilněji jsou fenolem inhibovány respirační enzymy buněk. Přebytek kyslíku v médiu výrazně snižuje citlivost buněk vůči inhibičnímu účinku fenolu. Metabolismus totální oxidace fenolu je spřažen s růstem buněk. Rychlost oxidace fenolu v přítomnosti esenciálních živin je vyšší než při jejich absenci. Významně větší vliv má přítomnost  $\text{PO}_4^{3-}$  iontů ve srovnání s  $(\text{NH}_4)^+$  ionty.

Autoři děkují Grantové agentuře ČR, projekt č. 104/00/0575 za finanční podporu.

## 12 KINETICKÁ ANALÝZA CHEMICKÉ A BAKTERIÁLNÍ OXIDACE PYRITU

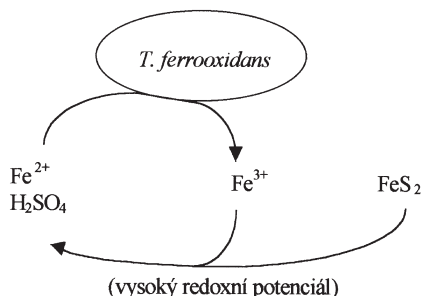
ŠÁRKA HELÁNOVÁ, MARTIN MANDL  
a IVA BARTÁKOVÁ

Katedra biochemie PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2,  
611 37 Brno

Oxidace pyritu v sulfidových odpadech vede k tvorbě kyseliny sírové v závislosti na stupni oxidace. Mechanismus procesu (úloha bakterií a trojmocného železa) je dlouhodobě diskutovanou otázkou. Pomocí elektrochemických metod se zjistilo<sup>1</sup>, že v přítomnosti bakterií byl počet vyměňovaných elektronů při oxidaci molekuly pyritu 14, bez bakterií 2, což svědčí pro úplnou biooxidaci pyritu na síranové ionty bez významnější tvorby siřných meziproductů. Pro určení bližšího mechanismu biooxidace byla provedena kinetická analýza oxidace pyritu ionty Fe(III) a bakteriemi *Thiobacillus ferrooxidans*.

Kineticky definovaný průběh chemické reakce se vyskytoval pouze na počátku reakce, pro který byly určeny objemová rychlostní konstanta a řád reakce, z nichž byla určena kinetická rovnice oxidace pyritu ionty Fe(III) pro případ tvorby síranových iontů nebo elementární síry (úplná a neúplná oxidace). Tak bylo zjištěno, že rychlost úplné oxidace pyritu ionty Fe(III) je při vyšších koncentracích Fe(III) shodná s rychlostí bakteriální oxidace pyritu (při velmi nízké koncentraci Fe(III)). Hodnoty redoxních potenciálů během bakteriální oxidace byly podobné hodnotám redoxních potenciálů v počáteční fázi reakce pyritu s vyššími koncentracemi Fe(III). To dokazuje tzv. nepřímý mechanismus, pyrit je oxidován chemicky ionty Fe(III), bakterie reoxidují vznikající Fe(II) a tím udržují vysoký redoxní potenciál roztoku nutný pro oxidaci pyritu až na kyselinu sírovou (obr. 1). Pro neexistenci přímého mechanismu (založeném na aktivitě sulfid oxidujících enzymů bakterií adsorbovaných na povrchu pyritu) a potvrzení shora uvedených závěrů svědčí nekorelovaná závislost rychlosti oxidace pyritu na koncentraci bakterií nad  $5 \cdot 10^7$  bakterií v 1 ml. Existuje pouze určitá limitní koncentrace bakterií potřebná k udržení dostatečné bakteriální aktivity k účinné reoxidaci Fe(II).

Na nepřímém mechanismu se podílí železooxidující systém bakterie *T. ferrooxidans*. V bioremediaci (odstraňování sulfidů a těžkých kovů z důlních odpadů) nebo biohydrometalurgii tak systém oxidace Fe(II) u *T. ferrooxidans* hraje podstatnější roli než systém oxidace síry. Jeho inhibice vede k neúplné oxidaci pyritu. Ve spontánních biogeochemických



Obr. 1. Schéma nepřímého mechanismu bakteriální oxidace pyritu

procesech v sulfidových odpadech však železooxidující systém může být hlavním faktorem okyselování prostředí.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 525/00/0785.

## LITERATURA

- Mandl M., Zeman J., Bartáková I., Veselá H., v: *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21<sup>st</sup> Century* (Amils R., Ballester A., eds.), part A, str. 423. Elsevier, Amsterdam 1999.

## 13 OXIDACE SÍRY ACIDOFILNÍ BAKTERIÍ *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*

PAVLA ČEŠKOVÁ, MARTIN MANDL,  
JITKA HUBÁČKOVÁ a ŠÁRKA HELÁNOVÁ

Katedra biochemie PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2,  
611 37 Brno

Síra vystupuje jako meziproduct biooxidace sulfidů. *Thiobacillus ferrooxidans* a *T. thiooxidans* představují hlavní acidofilní chemolithotrofní bakterie oxidující síru v prostředí sulfidových minerálů na kyselinu sírovou. V sulfidových odpadech tak dochází k okyselování prostředí a migraci těžkých kovů. Cílem práce je studium kinetiky růstu a oxidace síry u *T. ferrooxidans* za účelem kritického zhodnocení v současnosti známých kinetických modelů.

Při konstrukci kinetických modelů se vychází ze skutečnosti, že rozhodující metabolickou roli mají bakterie adsorbované na síře<sup>1-3</sup>. Tyto kinetické modely byly navrženy tak, aby vyhovovaly celkovému průběhu růstu a oxidace síry. Naše výsledky svědčí pro možnou kooperující roli adsorbovaných bakterií. Maximální počet těchto bakterií lze určit již z počátku kinetiky adsorpce<sup>4</sup>. Adsorbované bakterie tak mohou hrát zejména iniciační roli procesu oxidace síry. Při detailnějším záznamu růstu, koncentrace  $H^+$  a  $SO_4^{2-}$  lze detegovat 3 fáze: exponenciální, lineární a fázi snižující se rychlosti růstu a tvorby kyseliny sírové. Protože množství adsorbovaných bakterií se v průběhu oxidace síry mění bez odezvy na rychlost procesu a celkový proces můžeme popsat 3 fázemi, dospěli jsme k odlišným závěrům než výše uvedení autoři. Nízká rozpustnost síry zjevně vytváří podmínky pro limitaci metabolismu sírou. Nabízí se analogie s limitací plynným substrátem, kdy odpovídající lineární fázi růstu lze vyvodit i monodovskou kinetikou<sup>5</sup>. Krátká exponenciální fáze nelimitovaného procesu je pravděpodobně umožněna produkcí povrchově aktivních látek, které zvýší koncentraci koloidní síry v kultuře. Po zvýšení celkové oxidační aktivity rostoucích bakterií dochází k limitaci sírou vyúsťující v lineární fázi růstu i tvorby kyseliny sírové. Převážná část siřného substrátu tvoří nerozpustný rezervoár. Změny povrchu siřného substrátu by teoreticky měly ovlivňovat rychlost procesu. I po značném úbytku síry jsme však tyto změny nepozorovali, resp. fáze snižování rychlosti celkového procesu nastávala nekonstantně. To svědčí buď pro konstantní specifický povrch síry anebo proces jejího rozpouštění (obecně závislý na povrchu) je ovlivňován „biodegerentem“.

Limitace sírou se tak jeví jako rozhodující proces, který



charakterizuje podstatnou část kinetiky růstu a tvorby kyseliny sírové. Předpokládá to stejnou účast volných i vázaných bakterií na oxidačním procesu.

*Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 525/00/0785*

#### LITERATURA

1. Espejo R. T., Romero P.: Appl. Environ. Microbiol. 53, 1907 (1987).
2. Konishi Y., Takasaka Y., Asai S.: Biotechnol. Bioeng. 44, 667 (1984).
3. Gourdon R., Funtowicz N.: Bioprocess Eng. 18, 241 (1998).
4. Češková P., Mandl M., Hubáčková J.: Biotechnol. Lett., v tisku.
5. Mandl M.: Biologia (Bratislava) 39, 429 (1984).

#### 14 STUDIUM AKUMULACE TOXICKÝCH KOVŮ A RADIONUKLIDŮ KULTURAMI VYŠŠÍCH ROSTLIN

PETR SOUDEK<sup>a</sup>, RICHARD TYKVA<sup>b</sup>,  
HELENA LIPAVSKÁ<sup>c</sup>, JANA ALBRECHTOVÁ<sup>c</sup>  
a TOMÁŠ VANĚK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Oddělení explantátových kultur, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Oddělení radioizotopů, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>c</sup>Katedra anatomie a fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Viničná 5, 128 44 Praha 2

Od konce minulého století přispěl rozvoj těžby nerostů, průmyslu a stavebních aktivit ke zvyšujícímu se znečištění půd, které dosáhlo v posledních desetiletích alarmující úrovně. Neustálý nárůst průmyslové výroby, tlak různých ekologických organizací a v neposlední řadě také požadavek co nejnižší ekonomické náročnosti posunul do popředí zájmu výzkumu přírodní procesy umožňující bez větších finančních požadavků a další zátěže pro přírodu toto znečištění odstranit. Pro vyčištění takto kontaminovaných ploch už bylo použito mnoho různých fyzikálních, chemických a biologických procesů. Tyto procesy buď „dekontaminují“ půdy nebo polutanty v nich „stabilizují“ (cit.<sup>1</sup>). Rhizofiltrace<sup>2</sup>, nově objevená technologie využívající kořenů suchozemských rostlin pro remediaci z tekoucí kapaliny, je finančně efektivní metoda pro odstranění polutantů v koncentracích, které jsou mnohonásobně nižší než vhodné koncentrace pro konvenční metody, a konečné koncentrace se po vyčištění pohybují hluboko pod požadovanými přípustnými hodnotami znečištění. Počáteční výzkum se soustředil na mikroorganismy a na rostliny, které jsou přirozenými akumulátory, tzv. hyperakumulátory<sup>3</sup>, těžkých kovů v přírodě. V současné době se zájem soustřeďuje na rostliny, které by měly široké spektrum záběru, protože znečištění není pouze jednoho druhu, a dále na mikroorganismy a rostliny, které jsou geneticky manipulovány<sup>4</sup>. Výběr remediační strategie je závislý na druhu znečišťujících látek.

Cílem naší práce je optimalizace podmínek pro remediace těžkých kovů. Práce je prováděna na modelovém materiálu, kterým je *in vitro* kultivovaná hairy-root kultura křene (*Armo-*

*racia rusticana* L.) a sledujeme remediaci iontů Be<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup> (cit.<sup>5</sup>). U radionuklidů jsme se zaměřili na studium mechanismu rhizofiltrace radionuklidu <sup>137</sup>Cs pomocí hydroponicky pěstovaných rostlin slunečnice (*Helianthus annuus*), topolu (*Populus tremula*) a rákosu (*Phragmites communis*)<sup>6</sup>.

*Tato práce je podporována GA AV ČR projektem A 6055902, GA AV ČR projektem S 4055014 a projektem COST 837.10.*

#### LITERATURA

1. Gadd G. M., White Ch.: Trends Biotechnol. 11, 353 (1993).
2. Cunningham S. D., Ow D. W.: Plant Physiol. 110, 715 (1996).
3. Baker A. J. M., Brooks R. R.: Biorecovery 1, 81 (1989).
4. Speiser D. M., Abrahamson S. L., Banuelos G., Ow D. W.: Plant Physiol. 99, 817 (1992).
5. Soudek P., Podlipná R., Lipavská H., Vaněk T.: Pharmaceut. Pharmacol. Lett. 8 (4), 57 (1998).
6. Soudek P., Tykva R., Vaněk T.: J. Environ. Radioact., v tisku.

#### 15 MICROBIAL DEHALOGENATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS

JARMILA PAZLAROVÁ, MARTINA MACKOVÁ,  
and KATEŘINA DEMNEROVÁ

Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biotechnology, ICT Prague, Technická 3, 166 28 Prague, Czech Republic

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are composed of two benzene rings linked at the C-1 carbon. They are substituted in a great variety of combinations, with 1–10 chlorines in the *ortho*, *meta* and/or *para* positions leading to 209 possible compounds, referred to as PCB congeners. When PCBs are categorized by the degree of chlorination, the term homologue is used, e.g. the trichlorobiphenyl homologues. PCBs of a given homologue with different chlorine substitution positions are called isomers. The individual chlorine substitutions are further classified into singly or doubly flanked and unflanked chlorines, referring to whether the neighboring positions carry chlorine substitutions or not, respectively. Until banned in the former Czechoslovakia in 1984 (in the USA in 1978) PCBs were commercially manufactured as complex mixtures, each of which contains 50–90 PCB congeners<sup>1</sup>. Trade names for these mixtures include Delor 103 (Chemko, Strážské, Slovakia), Aroclor and Pyroclor (Monsanto, USA), Clophen (Bayer, Germany), Kanechlor (Kanegafuchi, Japan) and Phenoclor and Pyralene (Prodelec, France). PCBs were widely used in industry because of their excellent chemical and physical properties including low vapor pressures, low water solubility, excellent dielectric properties, stability to oxidation, flame resistance and relative inertness. The extensive use of PCBs has resulted in widespread contamination of air, water, soil and sediments. For example, one-third of the total USA production of PCBs (approximately 7×10<sup>5</sup> t) has been released into the environment through various venues by deliberate or accidental discharges<sup>2</sup>.

Although both the production for industrial use and the discharge of PCBs have been banned in our country, contamination with PCBs still occurs and is of great public concern due to bioaccumulation and potential toxicity to humans and wildlife. In spite of the fact that PCBs are generally regarded as stable compounds, biodegradation in the environment, although slow, has been demonstrated. Even if recently plant-associated dehalogenation has been proposed<sup>3</sup>, PCBs are mainly biodegraded by two distinct microbial processes: *i*) aerobic oxidative degradation and *ii*) anaerobic reductive dechlorination.

Aerobic degradation process has been studied in our laboratory rather extensively. The fundamental results were achieved with indigenous microorganisms *Pseudomonas putida*/2. The typical degradation profiles of this bacterium and physiology of PCB and their metabolic intermediates degradation will be presented. However, the aerobic degradation of PCBs usually attacks only lightly chlorinated congeners, i.e. biphenyls with five or fewer chlorines.

Anaerobic reductive dechlorination involves the removal of the chlorine substituents as halogen ions and their replacement by hydrogen in the form of electrons and protons. Reductive dechlorination is an important process in biodegradation of various highly chlorinated PCBs, because decreases their toxicity and thus increases their degradability, e.g. by converting the “co-planar”, dioxin like congeners into congeners with fewer chlorines<sup>4</sup>. Based on the published literature<sup>5</sup>, PCB reductive dechlorination is widespread in the environment although the rate, extent and specificity of microbial dechlorination vary widely. A brief review of anaerobic dechlorination in various environments will be presented.

#### REFERENCES

1. Schulz D. E., Petrick G. P., Duinker J. C.: Environ. Sci. Technol. 23, 852. (1989).
2. Hutzinger O., Veerkamp W., in: *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds* (Leisinger T., Hutter R., Cook A.M., Nuesch J., ed.). Academic Press, New York 1981.
3. Kučerová P., Macková M., Poláčková L., Burkhard J., Demnerová K., Pazlarová J., Macek T.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 1497 (1999).
4. Bedard D. L., Van Dort H. M., in: *Biotechnology in the*

*Sustainable Environment* (Sayler G. S., Sanserverino J., Davis K., ed.), p. 64. Plenum Publishing Corp., New York 1997.

5. Wiegel J., Wu Q.: FEMS Microbiol. Ecol. 32, 1 (2000).

#### 16 FIELD STUDIES EXAMINING RHIZOSPHERE-ENHANCED PCB DEGRADATION IN THE CZECH REPUBLIC

MARY BETH LEIGH<sup>a</sup>, JOHN S. FLETCHER<sup>a</sup>, DAVID P. NAGLE<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>b</sup>, and TOMÁŠ MACEK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>University of Oklahoma, Department of Botany and Microbiology, 770 Van Vleet Oval, Norman, OK, 73019, USA, <sup>b</sup>Institute of Chemical Technology, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, <sup>c</sup>Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

A collaborative US/Czech research project has been initiated to determine the long-term influence of vegetation on the microbial degradation of PCBs in contaminated soil. Two sites in the Czech Republic have been secured for this study in which a variety of plant species have naturally grown for at least 10 years in contaminated soil ranging in concentrations from 0–300 ppm. The oldest and largest plants present are maple (*Acer sp.*) and birch (*Betula pendula*) trees, in addition to ash (*Fraxinus excelsior*) and several grasses. The microorganisms associated with the roots of different plant species are being examined to identify plants that selectively foster the growth of PCB-degraders. Initial screening studies employing a 4-chlorobiphenyl agar plate assay have identified aggressive PCB-degrading bacteria associated with rhizosphere soil. In parallel, PCB-contaminated soil from the rhizosphere of mature plants (at least 10 years old) is being examined for evidence of congener degradation.

*The authors thank US National Security Education Program (NSEP), Graduate International Fellowship for support.*

**01 TRANSDUCTION OF AUXIN SIGNAL IN PLANT CELLS**EVA ZAŽÍMALOVÁ, JAN PETRÁŠEK,  
ALENA BŘEZINOVÁ, TOMÁŠ FELTL,  
and JAN MARTINEC*Institute of Experimental Botany, The Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic*

Auxins together with cytokinins are the key phytohormones involved in regulation of growth and development of plant cells under *in vitro* conditions. The present knowledge of endogenous auxin levels in various organs and/or tissues, of auxin long-distance transport as well as its translocation to the cell and out of the cell, and of auxin signalling cascade is relatively extensive. However, experimental data published are scattered to various plant cells, tissues, organs, etc., analysed at different stages of their development. Thus it is almost impossible to combine and correlate these data with the aim to develop a quantitative working hypothesis about the levels, movements, perception and transduction of auxin signal in relation to particular physiological state of particular cell and/or cell population.

We studied these parameters on the auxin-dependent, cytokinin-autonomous VBI-0 tobacco cell strain grown in suspension culture. This strain, originally derived from the stem pith of *Nicotiana tabacum* L., cv. Virginia Bright Italia, was used for its high spontaneous friability, polar filamentous phenotype and time-separated phases of cell division and elongation.

Under optimal conditions the endogenous free auxin (indole-3-acetic acid) level reached its maximum in the stationary growth phase almost in parallel with the maximum activity of the auxin efflux carrier (transporting the auxin anion out of the cells). The specific auxin-binding site (putative auxin receptor), displaying high affinity ( $K_D$  for the most active auxins in the order of magnitude  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup>) and low capacity (pmols of auxin per 1 g fresh mass), was detected on microsomal fraction. Its activity increased in the late exponential and early stationary phases when the polar cell growth began. On the same cell line some of the components of phosphoinositide signalling system were detected: phospholipase C, D-*myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor and IP<sub>3</sub> induced Ca<sup>2+</sup> release from microsomal vesicles. The results suggest a regulatory role of auxins in both cell division and elongation and possible involvement of phosphoinositide system in auxin signalling.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, project No.: 206/98/1510 to EZ, the EU, INCO Copernicus project No. ERBIC15 CT98 0118 and by the Ministry of Education, Youth and Sport, project OK379 (1999) to EZ.*

**02 VLIV GLUKOSYLACE NA HLADINU CYTOKININŮ A MOŽNOSTI JEJÍHO OVLIVNĚNÍ**RADOMÍRA VAŇKOVÁ, ELITZA BLAGOEVA,  
PETER DOBREV, ALENA GAUDINOVÁ,  
HANA SÜSSENBEKOVÁ a MIROSLAV KAMÍNEK*Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6*

Rostlinné hormony cytokininy vykazují řadu důležitých fyziologických funkcí, zejména stimulují buněčné dělení, podporují větvení a zpomalují stárnutí. Hladina jejich hlavních aktivních forem, *trans*-zeatinu a isopentenyladeninu (a jejich ribosidů), je v rostlinných buňkách velmi striktně regulována. Cytokininy působí autoindukčně, tzn. že zvýšení jejich hladiny, např. transportem nebo exogenní aplikací, stimuluje jejich biosyntézu v kompetentních buňkách. Inaktivace cytokininů probíhá buď štěpením postranního řetězce cytokininoxidasou nebo jejich glukosylací, a to buď přes kyslík postranního isoprenoidního řetězce nebo přes některý z dusíků na purinovém jádře. Při studiu mechanismů ovlivňujících hladinu cytokininů v buňkách jsme se zaměřili na *N*-glukosylaci, která je prakticky nevratná a má za následek trvalou deaktivaci.

*N*-Glukosylační systém je stimulován po přidání exogenního cytokininu benzyladeninu (BA) k buněčné suspenzi tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2. Endogenní cytokininy, BA a jeho *7N*- a *9N*-glukosidy byly po přečištění na reverzní fázi C<sub>18</sub> a sulfopropyl-Sephadexu rozděleny na HPLC pomocí DAD detektoru. Hladina derivátů BA byla stanovena přímo, koncentrace endogenních cytokininů byla kvantifikována v jednotlivých HPLC frakcích pomocí ELISA. Aplikovaný BA byl rychle glukosylován (81 % po 24 hod při fyziologické koncentraci 1,25 mmol.l<sup>-1</sup>). Neglukosylovaný BA stimuloval zvýšení hladin endogenních CK. Jejich přebytek byl v buňce odbouráván jak cytokininoxidasou, tak glukosylací, zejména dihydrozeatinu, který není substrátem tohoto enzymu. Kompetice BA a dihydrozeatinu při měření glukosylační aktivity pomocí radioaktivních substrátů (vyhodnoceno pomocí průtokového radiodetektoru) prokázala, že *N*-glukosylační systém má poměrně širokou specifitu zahrnující jak isoprenoidní, tak aromatické cytokininy. Při toxické koncentraci BA (20 μmol.l<sup>-1</sup>) bylo kromě zvýšení hladiny glukosidů endogenních cytokininů, detekováno i zvýšení koncentrace isopentenyladeninu a jeho ribosidu. Některé zvýšení hladin aktivních cytokininů bylo, přinejmenším částečně, příčinou toxického působení BA na buňky.

Inhibice glukosylace cytokininů by mohla umožnit přechodné zvýšení aktivních cytokininů, které je nezbytné k iniciaci řady fyziologických procesů (např. iniciace výhonků). Proto byl vyzkoušen inhibitor *N*-glukosylace papaverin<sup>1,2</sup>. Vzhledem k tomu, že inhibitory *N*-glukosylace jsou druhově specifické, byl použit stejný materiál jako v původní práci – klíčící rostliny ředkvičky (*Raphanus sativus* cv. Rampouch). Konverze radioaktivního substrátu dihydrozeatinu byla kvantifikována pomocí průtokového radiodetektoru. Bylo zjištěno, že stupeň inhibice narůstá až do koncentrace 5 mmol.l<sup>-1</sup>. Vzhledem k tomu, že koncentrace 7,5 mmol.l<sup>-1</sup> měla výrazné negativní efekty, byl v dalších pokusech používán 5 mmol.l<sup>-1</sup> papaverin. Závislost stupně inhibice na délce preinkubace

v přítomnosti inhibitoru ukázala, že v daném systému je efektivní inhibice dosaženo po 2 hodinách. Stupeň inhibice rovněž závisel na ontogenetickém stupni vývoje rostlin, citlivost vůči inhibitoru byla výrazně vyšší ve stadiu dvou pravých listů než ve stadiu děložních lístků.

Získané výsledky spolu s analýzami endogenních cytokininů naznačují, že basální hladina *N*-glukosylačního systému je poměrně nízká (s výjimkou suspenzí adaptovaných na zvýšenou přítomnost BA v mediu). Tento systém je ovšem velmi rychle aktivován v případě náhlého zvýšení hladiny cytokininů. Výsledků tohoto studia bude využito pro cílené manipulace s hladinami cytokininů v rostlinných buňkách a jejich prostřednictvím k ovlivnění vývoje rostlin.

*Autoři děkují za finanční podporu grantu GA ČR číslo: 522/99/1130.*

#### LITERATURA

1. Parker C. W., Entsch B., Letham D. S.: *Phytochemistry* 25, 303 (1986).
2. Hocart C. H., Letham D. S., Parker C. W.: *Phytochemistry* 30, 2477 (1991).

#### 03 SYSTEM FOR STRESS RESPONSE OBSERVATION BASED ON *IN VITRO* ASEPTIC TOBACCO PLANTLETS

PETRA NEŠNĚROVÁ<sup>a</sup>, ALEŠ SVATOŠ<sup>b</sup>,  
and TOMÁŠ MACEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, ICT Prague, 166 28 Prague,* <sup>b</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences, 166 10 Prague, Czech Republic*

Leaves of plants normally release small quantities of volatile chemicals, but when a plant is damaged by herbivorous insects<sup>1</sup>, many more volatiles are released. The chemical identity of the volatile compounds varies with the plant and insect species and type of wounding (monoterpenes, sesquiterpenes, aromatics, six-carbon alcohols, aldehydes, esters). Volatiles released from damaged plants have various functions, e.g. in response to insect damage plants emit a blend of volatile compounds<sup>2</sup>. Natural enemies of herbivores, such as parasitoid wasps or predatory insects, use these substances to locate their hosts. We talk about tritrophic interactions (plants-insect-parasitoids). Induced plant defence reactions can be local, but very often extend systemically through the plant, that is, they are not limited to the site of damage<sup>3</sup>. Such chemicals, which function in communication between and among species, as well as those that serve as messengers between members of the same species, are called semiochemicals<sup>1</sup>.

The signalling pathways may vary among plant species. Recent results suggest<sup>3</sup> a general underlying pattern for plant self-defence mechanisms. The key role in induced synthesis of volatiles has the biosynthesis of jasmonic acid (JA) or its methyl ester (MJ). The biosynthesis of JA (from linolenic acid) is induced by recognition of the primary elicitors that activate the plant's signalling system, the derivatives of JA then trigger the specific responses of the plant (gene encoding proteinase

inhibitors, antifungal proteins, defensive secondary metabolites etc.).

Many of actual bioassay test systems work with wounded plant tissue<sup>3</sup>, because it is necessary to wound plant (e.g. to excise leaves) prior to the addition of chemicals (elicitors of defence reactions). It is difficult to interpret results of such experiments, because the response induced by MJ may be overlapped by the high background induced by cutting the leaves. So, we are developing test system where no wounding of plant is required. We use small plantlets of *Nicotiana tabacum* cultivated under *in vitro* conditions. The possibility of using tobacco callus and cell suspension was tested with negative results, because they do not produce volatiles<sup>4</sup>. MJ in form of vapours is used as the elicitor of the stress reactions. The production of volatile substances was assayed by a combination of solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography (GC), volatiles were identified by mass spectrometry. We tested this system in comparing the antistress activities of some brassinosteroids (24-epiBR, "4075", "4154"). The proposed system proved to be reproducible, sensitive and stable.

*The work was supported by the grant GA AV CR A-4055803.*

#### REFERENCES

1. Paré P. W., Tumlinson J. H.: *Plant. Physiol.* 121, 325 (1999).
2. Stotz H. U., Kroyman J., Mitchell-Olds T.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 268 (1999).
3. Schröder F.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 1213 (1998).
4. Nešněrová P., Svatoš A., Macek T.: *Chem. Listy* 93, S62 (1999).

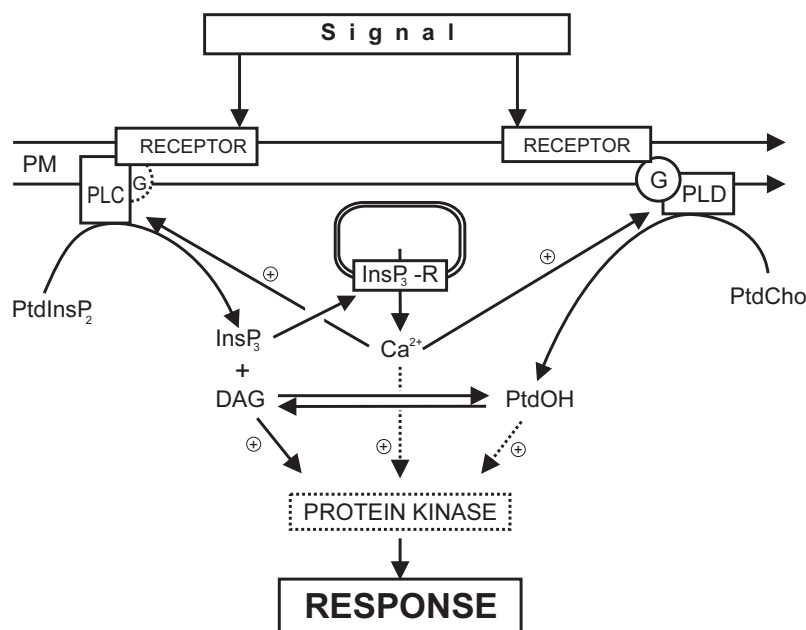
#### 04 BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF PHOSPHOLIPASE D $\alpha$ , $\beta$ , AND $\gamma$ FROM *BRASSICA NAPUS*

ZUZANA NOVOTNÁ<sup>a</sup>, OLGA VALENTOVÁ<sup>a</sup>,  
JAN MARTINEC<sup>b</sup>, BRONISLAVA PROFOTOVÁ<sup>a</sup>,  
and MICHAELA PLUSKALOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Chemical Technology Prague, Department of Biochemistry and Microbiology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic,* <sup>b</sup>*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of Czech Republic, Rozvojová 2, 165 02 Prague 6, Czech Republic*

The discovery of phosphoinositide signaling pathway has led to tremendous progress in elucidation how the extracellular signals are perceived by the cells and converted into intracellular responses. No doubt, the crucial role in this process belongs to phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC), but it becomes more and more clear, that phospholipid-based signaling is not so simple. Stimulation of surface receptors can trigger not only the PLC but also a variety of phospholipid metabolizing enzymes, such as phospholipase D (PLD), phosphoinositol 3-kinase (PI3K) and phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). The products of their reactions activate lot of target enzymes connected to numerous cellular processes.





Scheme 1

It is now generally accepted, that the plant signaling system does not differ too much from the animal one, even though the evidence is far from to be complete. The detailed information about the possible role of phospholipid metabolizing enzymes in plant signaling were reviewed recently by Munnik et al.<sup>1</sup> Simplified scheme shows the possible synergistic role of two most important enzymes in plant cells (Scheme 1).

Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4) hydrolyses phospholipids, liberating phosphatidic acid (PA) and the alcohol moiety which participates in the phosphodiester linkage (choline, ethanolamine, glycerol or inositol). Except this hydrolase function it is also able to transfer the phosphatidyl group to primary alcohols (ethanol, *n*-butanol). The enzyme, first discovered in carrot roots<sup>2</sup>, was then found to be widespread in plant kingdom. PLD from many sources has been purified and characterized and it has been recently cloned from yeast, bacteria, plant and mammalian cells<sup>3</sup>.

Both, soluble and membrane associated forms of the enzyme were described. It seems to be more likely, that so called soluble or cytosolic form is compartmentalised in vacuoles as described by Xu et al.<sup>4</sup> for young castor bean leaves. Enzyme in particulate form was found in mature leaves associated with plasma membrane.

Three different PLDs have been cloned from *Arabidopsis*, designated PLD $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . PLD $\alpha$ , which probably represents most of the PLDs described till now, requires high, non-physiological levels of Ca<sup>2+</sup>, while the other forms are activated by micromolar concentrations of Ca<sup>2+</sup> (Ref.<sup>5,6</sup>). PLD $\beta$  requires phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) as an activator and a relatively high amount of phosphatidylethanolamine (PE)<sup>7</sup>.

Recent studies in animal systems have emphasized that PLD activation and the subsequent formation of PA are steps in signal transduction cascades from the variety of ligands. In plants PLD has been involved in many physiological processes including senescence, aging, fruit ripening, stress injuries, wounding and pathogen attack<sup>8</sup>. Very little is known about its

role in signal transduction in plants but the first attempts has been already done. It was shown that PLD is stimulated by G-protein activators<sup>9,10</sup> such as mastoparan. Ryu and Wang<sup>11</sup> showed that abscisic acid (ABA) stimulates an increase in membrane associated PLD during senescence of castor bean leaf discs while cytokinin retarded this increase.

New approach of studying the phospholipid signaling pathway was recently proposed by Munnik et al.<sup>12</sup> It arises from the fact that PLC and PLD in animal cells are often activated at the same time<sup>13</sup>. Since the product of PLD action, PA can be dephosphorylated by phosphatidate phosphatase to DAG, both signaling pathways produce the same second messengers. In this respect, both described pathways may substitute each other in evoking the same responses.

Different PLD forms (PIP<sub>2</sub> dependent and PIP<sub>2</sub> independent) were identified in developing and germinating rape seeds (*Brassica napus*). Both forms were present in cytosolic and membrane fractions in early stages of seed maturation. PIP<sub>2</sub> dependent activity was mainly detected in the plasma and intracellular membrane fractions. This activity was increasing during the seed development while PIP<sub>2</sub> independent activity increased only at the very beginning of seed maturation.

Some biochemical characteristics (Ca<sup>2+</sup> requirements, pI, pH optimum, substrate specificity etc.) of both described forms are also presented.

*Presented research was supported by Grant Agency of Czech Republic No. 522/00/1332.*

#### REFERENCES

1. Munnik T., Irvine R. F., Musgrave A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1389, 222 (1998).
2. Hanahan D. J., Chaikoff I. L.: *J. Biol. Chem.* 168, 233 (1947).
3. Wang X.: *Trends Plant Sci.* 2, 261 (1997).
4. Xu L., Paulsen A. Q., Ryu S. B., Wang X.: *Plant. Physiol.* 111, 101 (1996).

5. Qin W., Pappan K., Wang X.: J. Biol. Chem. 272, 28267 (1997).
6. Pappan K., Qin W., Dyer J. H., Zheng L., Wang X.: J. Biol. Chem. 272, 7055 (1997).
7. Pappan K., Austin-Brown S., Chapman K. D., Wang X.: Arch. Bioch. Biophys. 353, 131 (1998).
8. Wang X., in: *Lipid Metabolism in Plants* (Moore T. S. Jr., ed.), p. 505. CRC Press, Boca Raton 1993.
9. Munnik T., Arisa S. A., deVrije T., Musgrave A.: Plant Cell 7, 2197 (1995).
10. Chapman K. D., Tripathy S., Venables B. J., Desouza A.: Plant Physiol. 116, 1163 (1998).
11. Ryu S. B., Wang X.: Plant Physiol. 108, 713 (1995).
12. Munnik T., van Himbergen J. A. J., ter Riet B., Braun F. J., Irvine R. F., van den Ende H., Musgrave A.: Planta 207, 133 (1998).
13. Exton J. H.: J. Biol. Chem. 272, 15579 (1997).

#### 05 CRYPTOGEIN MODE OF ACTION – THE ROLE OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> AND PHOSPHOLIPASE C

JAN MARTINEC<sup>a</sup>, TOMÁŠ FELTL<sup>a</sup>,  
DANIELA SEIFERTOVÁ<sup>b</sup>, KATERINA NOKHRINA<sup>c</sup>,  
GÜNTER SCHERER<sup>d</sup>, and EVA ZAŽÍMALOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic, <sup>b</sup>Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Charles University, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic, <sup>c</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Ukraine, 03022 Kiev, Ukraine, <sup>d</sup>Institut für Zierpflanzenbau, University of Hannover, Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover, Germany

Phospholipid signalling is now accepted as a common signal transduction mechanism in animal cells. The general role of phospholipid degrading enzymes, phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD) and phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) in the regulation of the plant cell metabolism is evident, nevertheless, the detailed action of phospholipases is still not known.

The effectiveness of plant defense reactions depends on the ability of the plants to recognize a pathogen early in the infection process. Molecules that indicate the presence of the pathogen (elicitors) activate host receptors and these rapidly generate an internal signal that triggers early defense responses involving a series of signal transduction events. The signal transduction events by which in many cases plants respond to a variety of environmental stress conditions involve activation of specific phospholipases<sup>1</sup>.

In this study we have investigated whether cryptogein, the protein elicitor (MW 10,323) secreted by fungus *Phytophthora cryptogea*, have caused an activation of PLA<sub>2</sub> and/or PLC during tobacco elicitation.

As model plant material we have used tobacco cell culture VBI-0 derived from the stem pith of *Nicotiana tabacum* L., cv. Virginia Bright Italia. PLA<sub>2</sub> activity has been measured using fluorescent phosphatidylcholine (bis-BODIPY-PC, Molecular Probes, USA) as substrate. Activity of PLC has been

determined using <sup>3</sup>H radiolabelled substrate phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

Activation of phospholipase A<sub>2</sub> after cryptogein treatment has been rapid (10 minutes, 2 μM cryptogein) and concentration-dependent. However, the activation of PLA<sub>2</sub> has also been detectable after 90 minutes of treatment by cryptogein in concentration as low as 0.1 μM. Cryptogein activation of PLA<sub>2</sub> has been inhibited by PLA<sub>2</sub> inhibitors (Helss, PACOCF<sub>3</sub>, AACOCF<sub>3</sub>) known from animal studies. These results indicate possible involvement of PLA<sub>2</sub> in the mode of action of cryptogein.

Phosphoinositide-specific phospholipase C of tobacco cell culture VBI-0 has been characterised and its role in cryptogein mode of action is currently investigated.

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, project No. 206/98/1510 to EZ, and by the EU, INCO Copernicus project No. ERBIC15 CT98 0118 to GS and EZ.*

#### REFERENCES

1. Chapman K. D.: Trends Plant Sci. 3, 419 (1998).

#### 06 THE ENZYMES IN PLANT DEFENCE RESPONSE TO PATHOGEN ATTACK (MODEL INTERACTION *PISUM SATIVUM* X *FUSARIUM* SPP)

LENKA LUHOVÁ<sup>a</sup>, DAGMAR JANČOVÁ<sup>a</sup>,  
ALEŠ LEBEDA<sup>b</sup>, and PAVEL PEČ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, <sup>b</sup>Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

Plants infected with pathogens like viruses, fungi, or bacteria react in a number of different ways. Defence mechanisms of plants include especially the production of active oxygen species, the synthesis of antimicrobial phytoalexins, the induction of hydrolytic enzymes (e.g. chitinase, glucanase), the creation of defence barriers (e.g. lignin, suberin), and the hypersensitive response<sup>1</sup>. The production of active oxygen species (AOS) (e.g. hydrogen peroxide and superoxide radical anion) plays a key role in plant defence. Plant cell has several ways of generating AOS: through action of plasma membrane NADPH oxidase; the pH-dependent AOS generation by cell wall-bound cationic peroxidase; germin-like oxalate oxidase and the amine oxidase reaction<sup>2</sup>. Produced AOS participate in the damage of the pathogen<sup>3</sup>, the cross-linking the soluble proteins into plant cell wall<sup>4</sup>, the lignification of cell wall<sup>5</sup>, and in the induction of a variety of defence-related genes expression. The final role of the induced oxidative burst may be its involvement to the complex of hypersensitive response<sup>6</sup>.

The main goal of this work was to study relationships between a degree of infection and changes of enzyme activities (peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase). The enzymes are thought to participate on metabolism of active oxygen species during the pathogenesis of *Pisum sati-*

*vum* (cultivars Smaragd and DP1059) by root pathogens *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. We determined enzyme activities in extracts of roots and aboveground parts of plants. Peroxidase and catalase activities significantly increased in roots after the pea infection. Amine oxidase activity is probably not directly involved in plant defence mechanism in this case. The decrease in the activity of acid phosphatase, detected in roots of infected plants, is in agreement with expected participation of this enzyme in the deactivation of NADPH oxidase<sup>7</sup>. The relationship between the intensity of the enzyme activity changes and the level of plant susceptibility was observed. Changes of enzyme activities were detected particularly in roots. Increased catalase activity was found only in aboveground parts of plants. After the infection of pea by *Fusarium* spp., important changes in isoenzyme profiles were demonstrated by the method of native PAGE for peroxidase and catalase. An increased peroxidase activity and a destruction of cells were confirmed by histochemical methods in root slices of infected plants. The lignification of rhizodermis was detected only in the cultivar Smaragd infected by *F. solani* causing root and stem rotting. On the contrary, the mechanism of *F. oxysporum* pathogenesis is different. This fungus causes vascular wilt of pea.

The participation of peroxidase, catalase and acid phosphatase in defence mechanisms of pea infected by root pathogens was confirmed. A correlation of enzyme activity changes to the level of plant susceptibility and to mechanisms of pathogenesis was also found.

*This work was supported by the grant MSM 153100010 of the Ministry of Education of the Czech Republic.*

## REFERENCES

1. Hammond-Kosack K. E., Jones D. G.: *Plant Cell* 8, 1773 (1996).
2. Wojtaszek P.: *Biochem. J.* 322, 681 (1997).
3. Peng M., Kuc J.: *Phytopathology* 82, 696 (1992).
4. Bradley D. J., Kjellbom P., Lamb C. J.: *Cell* 70, 21 (1992).
5. Olson P. D., Varner J. E.: *Plant J.* 4, 887 (1993).
6. Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.: *Cell* 79, 583 (1994).
7. Low P. S., Merida J. R.: *Physiol. Plant.* 96, 532 (1996).

## 07 IMMUNOCHEMICAL STUDIES OF PLANT PEROXIDASES

JARMILA ZÍDKOVÁ<sup>a</sup>, ZDENKA VOHNÍKOVÁ<sup>a</sup>,  
TEREZA TIETZE<sup>a</sup>, JIŘÍ SAJDOK<sup>a</sup>,  
ZUZANA NOVOTNÁ<sup>a</sup>, OLGA VALENTOVÁ<sup>a</sup>,  
JIŘÍ ŠKVOR<sup>b</sup>, and JAN KÁŠ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, <sup>b</sup>Faculty of Natural Sciences, Charles University, Albertov 6, 120 00 Prague 2, Czech Republic

Peroxidases represent large group of glycoproteins which are present in both animal and vegetable kingdom. Peroxidases are enzymes removing toxic hydrogen peroxide developed

in organism during oxidation processes. It has been proved that there is variety of plant peroxidase isoenzymes with different biological properties<sup>1</sup>. The most studied peroxidase is peroxidase from horseradish roots (*Armoracia rusticana*), not only due to availability but also for its application for ELISA techniques<sup>2</sup>.

Peroxidases are studied from the point of structural view, their function and biochemical properties. There are only few reports about immunochemical characterization of peroxidase proteins. Particularly, immunochemical reaction of carbohydrate part of the molecule is interesting due to the proposed relation to plant allergens<sup>3</sup>.

Rabbit polyclonal and various monoclonal antibodies against horseradish peroxidase were prepared.

Peroxidase from horseradish roots was purified by modified two – step precipitation of crude extract followed by ion exchange chromatography on HiTrap Q using Pharmacia FPLC system. The ion exchange chromatography was used to quantify the proportion of different isoenzymes. The purified peroxidase has been characterized. It was found that the isolated horseradish peroxidase contains isoenzyme with molecular weight 42 kDa and higher amount of immunochemically active isoenzyme with molecular weight around 58 kDa and 20 kDa, respectively.

Immunochemical studies of isolated peroxidase were compared with horseradish peroxidase purchased from Serva and peroxidase isolated from rape seed (*Brassica napus* L.). Immunoblotting, immunoprecipitation, radial immunodiffusion, rocket immunoelectrophoresis and ELISA were used for qualitative and quantitative studies. ELISA methods with polyclonal and various monoclonal antibodies against horseradish peroxidase were previously optimized.

It has been proved by ELISA that rape seed peroxidase cross – react with anti horseradish peroxidase antibodies. Reaction of rape seed peroxidase has reached 75 % reaction of commercial horseradish peroxidase sample. Higher amount of antigen determinants cross – reacting with polyclonal antibody has been found in anionic isoenzymes of rape seed peroxidase. The amount was approximately 50 % higher in comparison with cationic isoenzyme.

The interaction of monoclonal antibodies to horseradish peroxidase against isolated rape seed peroxidase was tested. Crossed immunoreactions with rape seed peroxidase were shown with following monoclonal antibodies: HPX 11 (96 %), HPX08 (90 %), HPX10 (62 %), HPX05 (51 %), HPX07A (31 %), HPX06 (26 %), HPX14 (24 %), HPX12 (20 %), HPX16 (18 %).

Cross – reaction of anti horseradish peroxidase antibodies against glycoproteins with similar carbohydrate component was compared by ELISA. Both following proteins ascorbate oxidase and phospholipase A<sub>2</sub> partially reacted with polyclonal and with some monoclonal antibodies against horseradish peroxidase. Reactions were substantially lower than to related peroxidases.

The aim of this work was to contribute to antigen determinant study of plant glycoproteins with polyclonal and monoclonal antibodies.

*The support of this research was provided by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 203/98/0682 and CEZ: MSM 223300006.*

## REFERENCES

1. Banci L.: J. Biotechnol. 53, 253 (1997).
2. Daussant J., Sajdok J.: *Introduction to Immunochemistry*, ISBN-80-7080-342-8.
3. Tams J. W., Welinder K. G.: FEBS Lett. 421, 234 (1998).

### 08 VLIV 20-HYDROXYEKDYSONU A IMPERATORINOVÉ FRAKCE NA AKTIVITU GLUTAMÁTKINASY PO JEJICH INJEKTOVÁNÍ DO ROSTLINNÝCH PLETIV

MILAN PAVLÍK<sup>a</sup>, LUDMILA STASZKOVÁ<sup>b</sup>,  
KAREL VOKÁČ<sup>a</sup>, KAREL GRÜNER<sup>a</sup>,  
JURAJ HARMATHA<sup>a</sup> a DANA HRADECKÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>ÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>ČZU v Praze, Kamýčká ul., 165 21 Praha 6

Injektování je vhodné pro sledování vlivu přírodních rostlinných látek chemicky labilních, špatně rozpustných, ale i všech dalších, u kterých je problematický průnik do rostlin pěstovaných *in vivo* přes soustavu krycích pletiv, tj. přes pokožku listů tvořenou v horní vrstvě kutikulou. Z literatury vyplývá, že řada faktorů, které ovlivňují metabolismus rostliny, ovlivňuje změnu aktivity glutamátkinasy (dále jen GK). Ověřili jsme injektováním vybraných přírodních látek jak čistých, tak frakcí, možnost sledovat jejich vliv na GK v testovaných rostlinách.

Růstová fáze pšenice odrůdy Sandra v době injektování byla na konci odnožování a na začátku sloupkování a špenátu odrůdy Carambole F1 ve fázi více jak 5–8 velkých pravých listů. Připravené roztoky 20-hydroxyekdysonu (dále jen 20E) a imperatorinové frakce byly injektovány u pšenice do bazálních článků (internodií), nebo těsně nad první uzlinou (nodie) stonku dané odnože rostliny a u špenátu do bazální části řapíku listů. Po třech týdnech od injektování byly jednotlivé varianty pšenice a špenátu sklizeny. Stanovení aktivity GK bylo provedeno spektrofotometricky obměnou hydroxamátové metody<sup>1</sup>.

Z výsledků stanovení aktivity GK pro jednotlivé varianty

(kontrola, 20E a imperatorinová frakce) u pšenice a špenátu vyplývá, že injektáž potvrdila význam tohoto způsobu aplikace přírodních rostlinných látek, u kterých chceme blíže zkoumat jejich vliv na metabolismus rostlinných buněk tvořících vnitřní pletiva. GK svým klíčovým významem pro metabolismus rostlinné buňky umožňuje, jak vyplývá z našich výsledků, sledovat vliv různorodých testovaných látek. Působením nižších koncentrací injektovaných látek, byla zvýšena aktivita GK, jak je vidět u pšenice. Při vyšších koncentracích těchto injektovaných látek, pak naopak dochází ke snížení aktivity GK, jak je vidět u špenátu, a to i přesto, že se 20E ve špenátu přirozeně vyskytuje. Regulace GK v metabolismu rostlinné buňky umožňuje provádět monitorování účinků např. allelopatického vlivu přírodních látek na vybrané rostliny.

*Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 203/98/0451.*

## LITERATURA

1. Vašáková L., Štefl M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 47, 349 (1982).

### 09 EFFECT OF BIOLOGICAL PREPARATIONS ON THE ACTIVITY OF GLUTAMATE KINASE IN CEREALS

LUDMILA STASZKOVÁ<sup>a</sup> and DANA HRADECKÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, <sup>b</sup>Department of Crop Production, Faculty of Agronomy, Czech Agricultural University, Kamýčká 957, 165 21 Prague, Czech Republic

The natural biologically active substances used here exert growth stimulative and regulatory effects in plants. Their importance lies in their potential use as substitutes for chemicals in plant production.

In our experiments the activity of the enzyme glutamate kinase in leaves of rye, wheat, barley and triticale was evaluated parallelly with chlorophyll content after treatment with the preparations of biologically active substances: cytokininine N<sup>6</sup>-

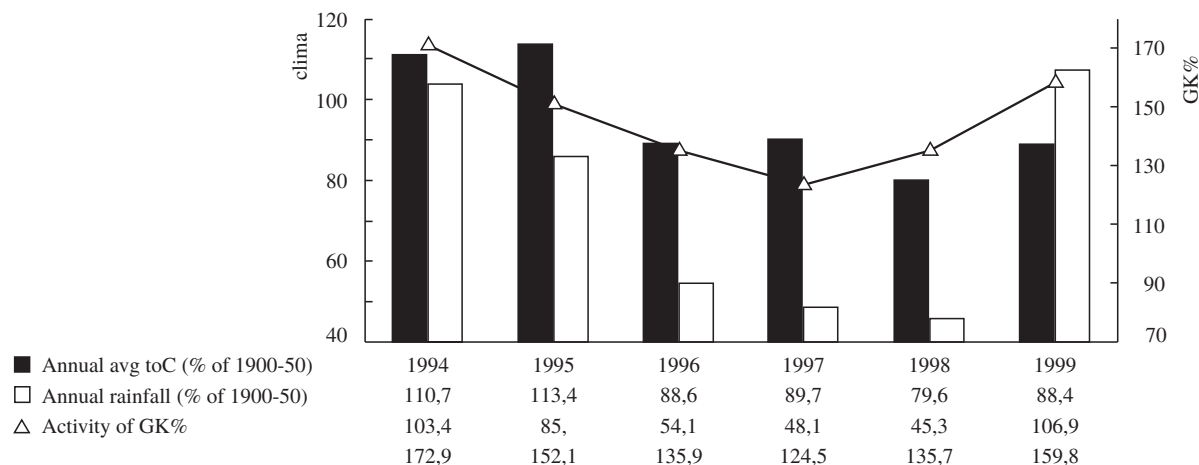


Fig. 1. The activity of glutamate kinase in flag leaves of spring wheat Sandra treated by topolin



Table I  
The effect of tested preparations in spring wheat Sandra (1994–1999)

Variant of treatment		Activity of glutamate kinase	Chlorophyll content	Grain yield	Average number of grains per ear	TKW
Values measured	Control	100.0 [%]	38.4 [mg.g <sup>-1</sup> ]	4.8 [t.ha <sup>-1</sup> ]	40.3 [pc.]	42.4 [g]
Relative values [%]	topolin	153.5	118.6	115.3	118.6	123.7
	24-epibrassinolide	147.7	120.8	118.5	123.3	116.6
	4154 brassinolide	117.4	113.1	113.4	130.2	112.1
	Biosphore	114.7	109.6	108.1	108.4	120.8
Statistics	<i>F</i> ratio ( <i>F</i> tab. = 3.84)	4.53	5.48	10.3	5.24	7.96
	Difference <i>D</i> <sub>α</sub> min	0.19	0.12	0.28	0.34	0.98

TKW = 1000 kernell weight, pc. = pieces per ear

-(*m*-hydroxybenzyladenosine) (= topolin) present in some wild plants<sup>1,4</sup>, 24-epibrassinolide and 4154-brassinolide<sup>4</sup>, and Biosphore (University of Pardubice), with a mixture of 2-amino benzoic and salicylic acids. Glutamate kinase (EC 2.7.2.11) is the enzyme controlling proline biosynthesis, specially the conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -glutamyl phosphate. Proline takes part in antistress plant metabolism as a source of energy. It is an important substrate for chlorophyll synthesis<sup>2,3,5</sup>.

The experiments were carried out in open fields and the preparations were applied in a spray in 40 DC (tillering) in concentration 1.10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>. The glutamate kinase activity was determined spectrophotometrically by a modification of the hydroxamate method<sup>2</sup>, and chlorophyll content was assessed from the acetonic extract<sup>3</sup>.

The results showed that all preparations enhanced the activity of glutamate kinase and chlorophyll content. The treatment affected all growth processes and increased the yield (Table I). The results with spring wheat (Sandra) from 1994 to 1999 suggest that the activity of glutamate kinase in cereals correlates with annual climatic variation, especially with rainfall (Fig. 1).

Supported by the research aim MSM No. 412100002 and by the grant No. 2060/21/05299/0.

## REFERENCES

- Horgan R.: *Phytochemistry* 22, 1103 (1983).
- Vašáková L., Štefl M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 349 (1982).
- Šesták Z., Čatský J.: *Methods of Studying Photosynthetic Productivity of Plants*, p. 427. Academia, 1966.
- Prusakova L. D., Cizova D. A., in: *Proceedings of the Conference on Brassinosteroids*, p. 9. Minsk 1995.
- Fedina L. S., Popova A. V.: *Photosynthetica* 32, 213 (1996).

## 10 AMINOOXIDÁZA V BIOSYNTÉZE ÓPIOVÝCH ALKALOIDOV V KLÍČNYCH RASTLINÁCH PAPAVER SOMNIFERUM L.

ANDREA BILKOVÁ, LÝDIA BEZÁKOVÁ,  
MARTINA BEBJÁKOVÁ, FRANTIŠEK BILKA,  
ANDREA BALAŽOVÁ a MIKULÁŠ PŠENÁK

*Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika*

Rastlinné aminooxidázy (AO) sa podieľajú na metabolizme biogénnych amínov, ktoré sú dôležité pre normálny rast a vývin rastlín a v odpovedi na stres a poranenie. Na druhej strane sa zúčastňujú biosyntézy rôznych skupín alkaloidov<sup>1</sup>. Prítomnosť AO v tvorbe alkaloidov odvodených od ornitínu (resp. arginínu) a lyzínu bola jednoznačne dokázaná<sup>2</sup>. Doteraz neobjasnená je účasť AO pri tvorbe benzylizochinolínového skeletu ópiových alkaloidov. Cieľom predloženej práce bolo určiť podiel AO v premene tyramínu na tyral v biosyntéze prvého spoločného intermediátu benzylizo-chinolínových alkaloidov v klíčnych rastlinách maku.

Aktivitu AO sme stanovili v 4-dňových klíčnych rastlinách maku meraním prírastku uvoľneného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a to použitím spektrofluorometrickej metódy. Toto stanovenie je založené na dimerizácii kyseliny homovanilovej ( $\lambda_{em}$  420 nm a  $\lambda_{exc}$  315 nm) v prítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cit.<sup>3</sup>). Pre porovnanie sme stanovili rovnakým spôsobom aj aktivity AO z klíčnych rastlín hrachu, bielych kvetov orgovánu a komerčnej tyramín špecifickej AO z *Arthrobacter* species.

Homogenát 4-dňových klíčnych rastlín maku sme purifikovali vysolením (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do 70 % nasýtenia; po dialýze a tepelnom šoku (65 °C) nasledovala gélová filtrácia na stĺpci Sephadexu G-150 a iónomeničová chromatografia na stĺpci HA-Ultrogelu. Týmto postupom sme dosiahli oddelenie troch foriem enzýmu s najvyššou špecifickou aktivitou 111,1 nkat.mg<sup>-1</sup>; 91,3 nkat.mg<sup>-1</sup> a 84,1 nkat.mg<sup>-1</sup>.

Na stanovenie substrátovej špecificity sme použili viacero aromatických a alifatických amínov. Hoci rastlinné AO sa vyznačujú širokou substrátovou špecificitou<sup>4</sup>, čiastočne purifikovaná AO z klíčnych rastlín maku prednostne využíva aro-

matické substráty, najmä tyramín. To by mohlo dokazovať účasť tohto enzýmu na tvorbe aldehyd kondenzačnej jednotky v biosyntéze ópiových alkaloidov. Podobne bol tyramín optimálnym substrátom aj u AO z bielych kvetov orgovánu a TO z *Arthrobacter* sp. AO z kľúčnych rastlín hrachu má najvyššiu afinitu k alifatickým amínom kadaverínu a putrescínu.

Pri charakterizácii AO z kľúčnych rastlín maku sme testovali efekt rôznych inhibítorov. Inhibičné vlastnosti vykazovali všetky testované látky: azid sodný > kupral > glutatión > etylhydrazín-5-OH > hydrogén siričitán sodný. Najvýraznejším inhibičným efektom sa vyznačoval azid sodný a kupral. Podobné inhibičné aktivity mali testované látky aj na aktivitu AO z bielych kvetov orgovánu, AO z *Arthrobacter* sp. a AO z kľúčnych rastlín hrachu, čo sú Cu-dependentné enzýmy. Toto môže nasvedčovať, že aj AO z kľúčnych rastlín maku patrí do tejto skupiny aminooxidáz.

*Táto práca bola podporená grantom VTP č. 98-513-I-03.*

#### LITERATÚRA

1. Bilková A., Bezáková L., Bilka F., Pšenák M.: *Cesk. Slov. Farm.* (v tlači).
2. Hashimoto T., Yamada Y.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 257 (1994).
3. Storer R. J., Ferrante A., v: *Methods in Molecular Biology* (Morgan D., ed.), str. 81. Humana Press Inc., Totowa 1998.
4. Medda R., Padiglia A., Floris G.: *Phytochem.* 39, 1 (1995).

#### 11 VPLYV ELICITÁCIE NA AKTIVITU POLYFENOLOXIDÁZY A OBSAH SANGUINARÍNU V SUSPENZNÝCH KULTÚRACH MAKU SIATEHO, *PAPAVER SOMNIFERUM* L.

ANDREA BALAŽOVÁ, FRANTIŠEK BILKA,  
VÍTAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ,  
ANDREA BILKOVÁ, LÝDIA BEZÁKOVÁ  
a MIKULÁŠ PŠENÁK

*Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Kalinčiakova 8 832 32 Bratislava, Slovenská republika*

Enzymologický aspekt predpokladaných biosyntetických dráh je stále aktuálnou otázkou v tvorbe alkaloidov a prírodných látok všeobecne. Rastlina maku je známa svojou schopnosťou produkovať morfinové alkaloidy. Majoritným alkaloidom *in vitro* kultúr maku je benzofenantridínový alkaloid sanguinarín. Spoločným segmentom v biosyntéze oboch podskupín benzylizochinolínových alkaloidov je tvorba (S)-retikulínu z dvoch molekúl L-tyrozínu tzv. pre-retikulínovou dráhou. Benzofenantridínový skelet vzniká z (S)-retikulínu, kým morfinány sa tvoria z (R)-formy retikulínu<sup>1</sup>. Enzýmy v tvorbe dopamínu a tyralu (základných stavebných jednotiek benzylizochinolínového skeletu) sa všeobecne, u rastliny maku zvlášť, zatiaľ bližšie nehodnotili. Zdá sa, že dostupnosťou základných stavebných jednotiek by sa mohla regulovať endogénna hladina alkaloidov v rastline maku siateho.

Suspenzné kultúry sa pripravili z kalusových kultúr maku

siateho, *Papaver somniferum* L. cv. MS-20. Na elicítáciu sa použil roztok elicitora pripraveného z mycélia *Botrytis cinerea*. Do živného média sa aplikovali po 14-dňovej subkultivácii 3 ml elicitora s glukózovým ekvivalentom 18 µg.ml<sup>-1</sup> elicitora. Po 48 hod. elicitácie sa v kontrolných a elicítovaných vzorkách stanovila celková a špecifická aktivita PPO. Natívnou PAGE elektroforézou sa sledovalo spektrum izoforiem PPO v suspenzných kultúrach. Izoformy PPO sa v géli detegovali 2 mM roztokom dopamínu<sup>2</sup>.

Sanguinarín sa v suspenzných kultúrach identifikoval TLC (cit.<sup>3</sup>) a obsah sa stanovil fluorescenčnou spektrofotometriou<sup>4</sup>.

V suspenzných kultúrach maku sa vplyvom elicitora pozoroval 3-násobný nárast celkovej špecifickej aktivity PPO oproti kontrolným vzorkám. Vzostup aktivity potvrdila aj natívna elektroforetická analýza izoforiem PPO. V géli sa identifikovali dve izoformy PPO s Rf 0,32 a 0,48. Intenzita zafarbenia izoforiem PPO z elicítovaných kultúr bola výraznejšia ako u neelicítovaných kultúr pri rovnakom obsahu bielkovín. Počet izoforiem PPO sa vplyvom elicitácie nemenil.

Obsah sanguinarínu v suspenzných kultúrach sa stanovil spektrofluorometrickým meraním. Elicitáciou došlo k 20-násobnému zvýšeniu množstva sanguinarínu oproti kontrolným vzorkám.

Nárast enzymovej aktivity v elicítovanej kultúre je priamym dôsledkom vplyvu elicitora na transkripčné procesy v bunkách suspenzných kultúr, čo vedie k zvýšenému obsahu sekundárnych metabolitov. Zvýšenie aktivity PPO je v súlade so zvýšeným obsahom sanguinarínu v elicítovaných suspenzných kultúrach. Uvedené výsledky naznačujú, že PPO môže byť jedným z regulačných enzýmov biosyntetickej dráhy tvorby benzylizochinolínových alkaloidov v rastline maku.

*Táto práca bola podporená grantom: VTP č. 98-513-I-03.*

#### LITERATÚRA

1. Balažová A., Pšenák M.: *Chem. Listy* 92, 1006 (1998).
2. Rodriguez M. O., Flurkey H. W.: *J. Chem. Educ.* 69, 767 (1992).
3. Mitcher L. A., Park Y. H., Clark D.: *Lloydia* 41, 145 (1978).
4. Pšenák M.: *Biológia* 46, 1109 (1991).

#### 12 PROTEOLYTICKÉ PROCESY V HLUZÁCH *COLCHICUM AUTUMNALE* L.

HAJNALKA KOMJÁTHYOVÁ,  
KATARÍNA CIBIROVÁ, LÝDIA BEZÁKOVÁ,  
MÁRIA BENEŠOVÁ a MIKULÁŠ PŠENÁK

*Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika*

*Colchicum autumnale* L. (jesienka obyčajná) sa vyznačuje osobitým životným cyklom<sup>1</sup> a schopnosťou tvoriť špecifickú skupinu alkaloidov – kolchicoidov. Jej zvláštny životný cyklus je viazaný na rast, vývin a metabolické procesy prebiehajúce v hluzách. Po vytvorení novej dcérskej hľuzy, pôvodná materská hľuza sa stáva pravým zásobným orgánom a postupne fyzicky zaniká. Degradáčne produkty zásobných látok

starej hľuzy sa pravdepodobne translokujú do novej hľuzy, kde sa reutilizujú. V súlade s tým, počet izoforiem polyfenoloxidázy<sup>2</sup>, amylázy a obsah celkových extrahovateľných bielkovín v priebehu starnutia hľuzy klesá takmer na nulové hodnoty. Reutilizácia bielkovín starej hľuzy predpokladá aktívny proteolytický proces.

Pri elektroforetickom stanovení spektra bielkovín natívnou PAGE sa zistilo, že spektrum bielkovín v hľuzách sa pozoruhodne mení počas životného cyklu jesienky. V hľuzách jesienky je prítomný tzv. veľký bielkovinový komplex, ktorý pozostáva z 5 až 7 podjednotiek.

Z endopeptidáz sa stanovila aktivita BAPA-ázy (*N*-benzoyl-arginín-*p*-nitroanilid hydrolázy)<sup>3</sup>, ktorá bola najaktívnejšia pred fyzickým zánikom hľuzy (1,85  $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). V novej hľuze najvyššia špecifická aktivita sa zaznamenala v zimnom kľudovom období (1,80  $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Z exopeptidáz sa stanovili aktivity niektorých aminopeptidáz<sup>4</sup>, karboxypeptidáz<sup>5</sup> a dipeptidáz<sup>6</sup>. Aktivita aminopeptidáz sa stanovila na substrát L-alanín a L-leucín *p*-nitroanilid hydrochlorid. Najvyššia špecifická aktivita týchto enzýmov bola pozorovaná v období vegetačného kľudu (36,4  $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$  v novej a 17,8  $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$  v starej hľuze). V hľuzách jesienky sa stanovila aj špecifická aktivita glycín-prolín dipeptidylpeptidázy s maximálnou špecifickou aktivitou 0,45  $\mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Karboxypeptidázová aktivita sa stanovila na substrát Z-Glu-Phe a Z-Glu-Tyr. Ich špecifická aktivita bola najvyššia v období pred fyzickým zánikom starej hľuzy (0,65  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  a 1,8  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a v novej hľuze v januári (1,8  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  a 31,75  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

Sledovanie zmeny v obsahu celkových rozpustných bielkovín, spektra bielkovín natívnou PAGE a hodnotenie proteolytického procesu umožňuje čiastočne vysvetliť niektoré špecifické životného cyklu *C. autumnale* L.

#### LITERATÚRA

1. Komjáthy H., Franková L., Bóka K., Pšenák M.: Acta F. R. N. Univ. Comen. – Botanica 40, III (2000).
2. Bilecová D., Šimánek V., Jeloková J., Pšenák M.: Biológia 51, 323 (1996).
3. Kovács P., Dufková-Barančeková J., Pšenák M.: Biológia 40, 345 (1985).
4. Bergmayer H. V.: *Methods of Enzymatic Analysis*, sv. V. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988.
5. Benešová M., Kovács P., Pšenák M.: J. Plant Physiol. 143, 161 (1994).
6. Benešová M., Kovács P., Pšenák M., Barth A.: Biológia 42, 779 (1987).

### 13 PEPTIDHYDROLÁZY V BUNKOVÝCH ORGANELÁCH KLÍČKOV KUKURICE

MÁRIA BENEŠOVÁ, MONIKA ALMÁSIOVÁ,  
LÝDIA BEZÁKOVÁ a MIKULÁŠ PŠENÁK

*Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta UK, Bratislava, Slovenská republika*

V matrici mitochondrií a strome chloroplastov *Zea mays* L. var. „Sachara“ bol s použitím *p*-nitroanilidov L- aj D-ami-

nokyselín identifikovaný a charakterizovaný súbor aminopeptidáz.

Rastlinné peptidhydrolázy sú obvykle študované v súvislosti s určitými fázami životného cyklu rastlín, akými sú degradácia zásobných bielkovín pri klíčení (lokalizovaných vo vakuolách a proteínových telieskach) a na procesy spojené s reutilizáciou zásobných proteínov v priebehu senescencie. Proteolýza je nevyhnutná aj pre zabezpečenie iných životne dôležitých funkcií, akými sú zachovanie vyváženej látkovej premeny bunky a odpoveď na stres, účasť pri aktivácii zymogénov a peptidových hormónov limitovaným štiepením, kontrola metabolizmu, homeostázy a vývoja redukovaním množstva kľúčových enzýmov a regulačných proteínov<sup>1</sup>. Niektoré proteinázy sú zapojené do programovanej smrti špecifických rastlinných orgánov, alebo buniek.

V našich predchádzajúcich prácach bola v matrici mitochondrií izolovaných z epikotylov klíčkov kukurice *Z. mays* L. charakterizovaná ATP-závislá proteináza s podobnými vlastnosťami ako Lon proteináza z *E. coli* a jej analógy z pečene potkanov a mitochondrií kvasiniek<sup>2</sup>. Aktivita podobnej ATP-závislej proteinázy bola prítomná aj v chloroplastoch listov špenátu<sup>3</sup>.

Súčasná práca študuje peptidhydrolázy v bunkových organelách listov rastlín. Na stanovenie aktivít aminopeptidáz<sup>4</sup> v matrici mitochondrií a strome chloroplastov sa použili *p*-nitroanilidy L-Ala, D-Ala, L-Leu, D-Leu, L-Glu, L-Phe, D-Phe, L-Tyr, L-Pro. Pri štvorstupňovom purifikačnom procese sa v matrici mitochondrií dosiahlo 6,73-násobné prečistenie L-Ala-APázy a 4,48-násobná purifikácia L-Leu-APázy. S podobnou účinnosťou sa purifikovali aminopeptidázy stromy chloroplastov (6,37-násobne L-Ala-APáza a 5,65-násobne L-Leu-APáza). Najintenzívnejšie hydrolyzovanými substrátmi v matrici mitochondrií boli L-Phe-, L-Leu- a L-Ala-pNA, v strome chloroplastov L-Ala-, L-Phe- a L-Leu-pNA. Substráty D-amino-kyselín boli hydrolyzované s 10-násobne nižšou účinnosťou. Čiastočne purifikované aminopeptidázy matrixu mitochondrií inhiboval PMSF, inhibitor serínových proteináz. Inhibične pôsobili aj chelatovné látky EDTA a fenantrolín, ktoré sa prejavili tiež ako účinné inhibitory aminopeptidáz stromy chloroplastov.

Výsledky našej práce poukazujú na to, že v matrici mitochondrií buniek zo kotyledónov (4-dňových) a stromy chloroplastov (2-týždňových listov) kukurice je aktívne spektrum peptidhydroláz, ktoré sú spolu s endopeptidázami zapojené do metabolických premien proteínov.

*Práca bola podporená grantom č. 2/2006/99 Slovenskej grantovej agentúry.*

#### LITERATÚRA

1. Vierstra R. D.: Plant Mol. Biol. 32, 275 (1996).
2. Almásiová M., Perečko D., Bezáková L., Benešová M., Bilka F., Pšenák M., Kutejová E.: Chem. Papers 52, 602 (1998).
3. Benešová M., Ďurčová G., Kužela Š., Kutejová E., Pšenák M.: Phytochemistry 41, 65 (1996).
4. Benešová M., Senkpiel K., Kovács P., Barth A.: Biochem. Physiol. Pflanzen 175, 252 (1980).

#### 14 ALELY HORDEINOVÝCH LOKUSŮ HRD-1, HRD-2 A HRD-3 ZJIŠTĚNÉ METODOU SDS-PAGE U ODRŮD JEČMENE (*HORDEUM VULGARE* L.) REGISTRVANÝCH V ČR

SVĚTLANA SÝKOROVÁ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6

Podle UPOV (Mezinárodní Unie pro ochranu nových odrůd rostlin) byly stanoveny znaky a vlastnosti, které jsou rozhodující pro stanovení odlišnosti dané odrůdy od ostatních. Pro ječmen a pšenici byly tyto znaky navíc doplněny přílohou o speciální kategorii charakteristik zjištěných pomocí elektroforézy proteinů. Rozdíly takto nalezené lze však použít pouze jako doplňující k jiným odlišnostem v morfologických nebo fyziologických znacích.

Pro analýzu hordeinů (prolaminovou frakci zásobních proteinů zrna ječmene) jsou UPOV doporučeny 2 metody elektroforézy v polyakrylamidovém gelu: SDS-PAGE, případně Acid-PAGE. Hordeiny analyzované pomocí SDS-PAGE jsou kódovány třemi složenými lokusy Hor-1(C), Hor-2(B) a Hor-3(D) na chromozomu 5. Projevem každého lokusu je řada alel. Elektroforetická analýza hordeinů s genetickou interpretací je založena na rozpoznání alel z proteinů, které se po elektroforéze objeví na gelech jako serie dobře definovaných pruhů. Alely každého lokusu mohou být označeny číslicemi v pořadí lokusů Hor-3(D), Hor-1(C), Hor-2(B) (podle klesající relativní elektroforetické mobility pruhů REM).

Byly použity etalonové vzorky většiny v ČR registrovaných odrůd jarního a ozimého ječmene, které poskytl ÚKZÚZ. Jako standardů se známými alelami studovaných hordeinů bylo použito 26 jarních i ozimých odrůd světového sortimentu ječmene, které byly v roce 1999 získány z kontrolní organizace GEVEZ ve Francii.

SDS-PAGE byla prováděna podle předpisu UPOV TG/19/10 94-11-04 (cit.<sup>1</sup>) s modifikací u zaostřovacího gelu<sup>2</sup> (mechanické vlastnosti). K vyhodnocení elektroforeogramů byly použity tabulky alel jednotlivých lokusů podle UPOV s uvedením REM jednotlivých pruhů a odrůdy – standardy, které byly vždy nanášeny spolu s vzorky na každý gel.

Bylo zjištěno, že elektroforetická spektra obsahují i řadu pruhů, které nenáležejí uvedeným třem hordeinovým lokusům (jedná se zřejmě o proteiny jiných frakcí), což komplikuje a znesnadňuje identifikaci alel. Odrůdy, kde se nepodařilo jednoznačně alely identifikovat, budou dále intenzivně studovány. V souboru odrůd se vyskytují skupiny s identickou skladbou hordeinů, což již bylo zjištěno i jinými metodami elektroforézy<sup>3</sup>. Uvedená metoda elektroforézy bude dále rozšířena na větší počet zrn každé odrůdy pro statisticky průkazné zjištění existujícího vnitroodrůdového polymorfismu, popsaného např. elektroforézou hordeinů ve škrobovém gelu v kyselém prostředí<sup>3</sup>.

Podle UPOV bylo dosud popsáno pro lokusy Hor-1 14 alel, Hor-2 21 alel a Hor-3 5 alel, kdy alely téhož lokusu jsou navzájem velmi blízké hodnotami REM, a proto jejich určení u konkrétních odrůd by bylo bez odrůd standardů prakticky nemožné. Charakterizaci odrůd pomocí genetických markerů (např. zásobních proteinů) lze využít k jejich identifikaci,

kontrolu odrůdové pravosti a čistoty a ve šlechtitelských hybridizačních programech.

Tato práce byla podpořena řešením projektu NAZV EP 0960006462

#### LITERATURA

1. UPOV: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Barley. (Additional useful explanations). TG/19/10, 94-11-04.
2. Laemmli V. K.: Nature (London) 227, 680 (1970).
3. Bradová J., Sýkorová S., Šašek A.: Czech. J. Genet. Plant. Breed. 34, 131 (1998).

#### 15 KONTROLA POLYMORFISMU ODRŮD JEČMENE ELEKTROFORÉZOU HORDEINŮ

JANA BRADOVÁ a ANTONÍN ŠAŠEK

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6

Bílkovinné genetické markery ječmene tj. hordeinové bílkoviny ječného zrna lze využít nejen k markerování některých hospodářsky významných znaků, vlastností<sup>1</sup> a k identifikaci odrůd ječmene, ale i k hodnocení stálosti hordeinově polymorfních odrůd.

K elektroforetickým analýzám hordeinů byly použity standardní (etalonové) vzorky semen registrovaných odrůd jarního a ozimého charakteru ze sklizní 1992–1998, poskytnuté Odborem odrůdového zkušebnictví Ústředního a kontrolního ústavu zemědělského<sup>2</sup>.

Hordeinová elektroforetická spektra byla získána vertikální elektroforézou ve sloupcích škrobového gelu s Al-laktátovým pufrem o pH 3,1 s 2 mol.l<sup>-1</sup> močoviny. Alelické hordeinové bloky byly vyčleněny podle již publikovaných katalogů<sup>3</sup>.

Pomocí elektroforetické analýzy hordeinových bílkovin – genetických markerů ječmene byla hodnocena genetická struktura registrovaných odrůd ječmene jarního a ozimého. Odrůdy ječmene lze hodnotit jako čisté linie homogenní ve skladbě hordeinů, či jako populace hordeinově polymorfní. Z celkového počtu 40 odrůd jarního typu je 70 % odrůd homogenních ve skladbě hordeinů a 30 % odrůd hordeinově polymorfních. Z 15 sledovaných odrůd ozimého ječmene je hordeinově polymorfních odrůd 13,3 %.

Použitím hordeinových signálních genů je možné kontrolovat, zda udržování registrovaných odrůd ječmene zachovává stálost genetické skladby víceliniových odrůd – populací.

Byla stanovena a porovnána elektroforetická spektra hordeinů 14-ti odrůd jarního ječmene a 4 odrůd ozimého ječmene a to hodnocením etalonových vzorků osiv výše zmíněných odrůd, dodaných Odborem odrůdového zkušebnictví ÚKZÚZ Brno. První variantu představují etalonové vzorky z let 1992 až 1998, druhou pokusnou variantu pak etalonové vzorky těchto odrůd ze sklizně 1998, dodané v roce 1999. Z 18 polymorfních odrůd vykazovalo za posuzované období (od r. 1992 do r. 1999) stálost genetické struktury, markerované hordeinovými signálními geny pouze 9 odrůd tj. Jubilant, Kompakt, Olbram, Perun, Sladko, Svit, Terno, Viktor, Sgra, což činí



50 %. V šesti prípadoch došlo ke ztráte jedné či dvou hordeinových linií pôvodní genetickej štruktúry hodnocených polymorfických odrôd (Heran, Primus, Signal, Stabil, Kromir, Kromoz). Ve třech prípadoch byla původní skladba hordeinových linií o jednu či dvě linie rozšířena (Pejas, Scarlett, Luxor). Elektroforetická analýza hordeinů umožňuje stanovit nejen kvalitatívni rozdíly, ale i kvantitatívni rozdíly v zastoupení jednotlivých hordeinových linií, jednotlivých genotypů čistých linií, v průběhu několika cyklů udržování odrůd – populací.

Jako příklad lze uvést odrůdu Jubilant registrovanou v roce 1991. Tato odrůda byla již hodnocena v roce 1990 jako perspektivní novošlechtění SK 2777 11 a podle relativní četnosti byla stanovena hlavní linií linie A (77 %) a vedlejší linií linie B (23 %)⁴. Zmíněný poměr se změnil v roce 1993, kdy linie B se stala doprovodnou linií (8 %)⁵. Avšak analýza hordeinů této odrůdy ze sklizně 1998 prokázala obrácený poměr v zastoupení obou linií (A 6 %, B 94 %).

Pozorované změny ve skladbě odrůd – populací, respektive v podílu jednotlivých linií svědčí o záměrných, či neúmyslných zásazích do genetickej štruktúry odrůd – populací ječmene během několika cyklů udržování zmíněných odrůd.

Tato práce byla podpořena řešením projektu NAZV EP 0960006462.

#### LITERATURA

1. Černý J., Šašek A., Langer I., Bradová J., Pařízek P., Veil P., Vopršal J.: *Scientia Agric. Bohemoslov.* 30, 185 (1999).
2. *Seznam odrůd, zapsaných ve Státní odrůdové knize ČR k 1.8.1998.* ÚKZÚZ
3. Šašek A., Bradová J., Černý J., Necvetajev V. P.: *Scientia Agric. Bohemoslov.* 22, 1 (1990).
4. Šašek A., Černý J., Bradová J., Pařízek P.: *Rostl. Vyr.* 38, 745 (1992).
5. Šašek A., Bradová J., Černý J.: *Potrav. Vědy* 13, 57 (1995).

#### 16 IDENTIFIKÁCIA, DIFERENCIÁCIA A CHARAKTERIZÁCIA GENOTYPOV KOLEKCE ZRNA PŠENICE POMOCOU SDS-PAGE

JÁN KRAIC<sup>a</sup>, EDITA GREGOVÁ<sup>a</sup>,  
ZDENKA GÁLOVÁ<sup>b</sup> a HENRIETA KNOBLOCHOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, <sup>b</sup>Katedra biochémie a biotechnológie AF SPU, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

Zásobné bielkoviny zrna obilnín sú reprezentované predovšetkým gluténom, ktorý je lokalizovaný v endosperme zrna. Gluténové bielkoviny tvoria okolo 80 % z celkového obsahu bielkovín zrna pšenice. Vysoká heterogenita, druhová a genotypová špecifickosť, rozdielne fyzikálno-chemické vlastnosti ako i skutočnosť, že ich biosyntéza sa realizuje v endosperme v poslednej fáze tvorby zrna, ich predurčuje plniť úlohu markérov hospodársky významných znakov a vlastností.

Cieľom práce bolo analyzovať zásobné bielkoviny zreých semien a ich využitie ako molekulárnych markerov pre identifikáciu, diferenciaciu a charakterizáciu genotypov jarnej a ozimnej pšenice. Identifikovaných a diferencovaných na základe glutenínového polymorfizmu bolo 18 vzoriek zrna pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), 13 vzoriek zrna špaldovej pšenice (*T. spelta* L.), 9 vzoriek hrubozrnnej tvrdej pšenice (*T. turgidum* L.) a 5 vzoriek tvrdej pšenice (*T. polonicum* L.). Všetky vzorky boli získané z Génovej banky ČR v Prahe a z Génovej banky SR v Piešťanoch. Gluténové bielkoviny boli extrahované a analyzované vertikálnou diskontinuálnou elektroforézou na PAGE v prítomnosti SDS podľa metodiky ISTA. Elektroforetické profily boli vyhotovené na denzitometri LD-01 Instrument pri vlnovej dĺžke 632,8 nm. Ako štandardy boli použité odrody Chinese Spring a Marquis. Identifikácia jednotlivých HMW glutenínových podjednotiek a výpočet Glu-hodnotenia boli realizované podľa katalógu Payneho a kol.<sup>1</sup>

Z technologického hľadiska gluteníny vplyvajú na elasticitu čiže pružnosť a pevnosť cesta a gliadíny na viskozitu – rozťažnosť a rozplývavosť cesta. Glutenín tvoria dve skupiny podjednotiek a to vysokomolekulárne (HMW) a nízkomolekulárne (LMW) subjednotky. Približne 50 % zásobných bielkovín predstavujú gliadíny, zvyšných 10 % tvoria HMW glutenínové a 40 % LMW glutenínové podjednotky. Bolo dokázané, že LMW glutenínové subjednotky ovplyvňujú štruktúru a funkčnosť gluténu, avšak sú v tomto smere podriadené HMW subjednotkám<sup>2</sup>. A práve zastúpenie jednotlivých HMW glutenínových subjednotiek ovplyvňuje kvalitu zrna pšenice<sup>3</sup>.

Z elektroforeogramov 18 vzoriek zrna pšenice letnej formy ozimnej vyplýva, že na lokuse Glu-A1 sa najčastejšie vyskytovala nulová alela (83 %), lokus Glu-B1 bol reprezentovaný subjednotkou 7+9 (83 %), ktorá zvyšuje chlebopekárskú kvalitu. Pri odrôch Torysa a Marys Maksman bola detekovaná podjednotka 7+8 a pri línii SK 3756-1-76 subjednotka 6+8, ktoré znižujú technologickú kvalitu pšenice. Z alel lokalizovaných na lokuse Glu-D1 sa nachádzalo 67 % subjednotiek 5+10, ktoré pozitívne prispievajú k technologickému kvalite zrna pšenice a 33 % subjednotiek 2+12, ktoré naopak negatívne ovplyvňujú túto kvalitu. Najvyššie bodové Glu hodnotenie (9) dosiahli odrody Ilona, Vlada a Régia, ktoré patria k dobrým potravinárskym pšeniciam. Naproti tomu najnižšie Glu-score (5) dosiahli odrody Iris, Sana, Vala a línia SK 3756-1-76, čo potvrdili i nízke hodnoty SDS sedimentačného testu v rozsahu 32–56 cm. Ďalej bolo analyzovaných 13 vzoriek zrna pšenice *T. spelta* L., pričom z výsledkov vyplýva, že vo vzorkách zrna špaldovej pšenice sa najčastejšie vyskytujú podjednotky 1, 6+8, 2+12 s priemerným Glu hodnotením 6,4, čo zodpovedá pšenici so strednou pekárskou kvalitou. Najlepšiu technologickú kvalitu na základe zastúpenia HMW podjednotiek vykázali odrody Spalda-Landrace 1-96, pri ktorej boli určené podjednotky 1, 7+9, 5+10 s Glu hodnotením 9, odroda Ardenne, pri ktorej boli určené podjednotky 1, 6+8, 5+10 s Glu-score 8 a Bauländer Spelz s podjednotkami 1, 13+16, 2+12 a s Glu-score 8. Vzácné sa vyskytujúca podjednotka 20 bola detekovaná pri odrode Renval (1, 20, 2+12) s Glu-score 6 a subjednotka 13+16 pri odrode Bauländer Spelz. Z tetraploidných pšeníc bolo analyzovaných 9 vzoriek pšenice hrubozrnnej (*T. turgidum* L.). Na lokuse Glu-A1 bola detekovaná alela 1 pri siedmich odrodách, len pri kultivare Turgidum di Maliani bola určená nulová alela, ktorá negatívne ovplyv-

ňuje technologickú kvalitu pšenice a pri odrode Požehnaná alela 2\*, ktorá zasa kladne ovplyvňuje pekárenskú kvalitu pšenice. Z alel lokalizovaných na lokuse Glu-B1 boli detekované podjednotky 6+8 pri ôsmych odrodách. Pri Turgidum di Maliani boli identifikované podjednotky 13+16, ktoré záporne ovplyvňujú technologickú kvalitu pšenice, čo sa drážilo aj vo výslednom Glu hodnotení (2). Prítomnosť individuálnych HMW glutenínových subjednotiek bola vyhodnotená bodovým Glu-score, pričom najvyššie Glu-score (4) dosiahlo 8 odrôd, čo svedčí o pšenici s nízkou pekárenskou kvalitou. Z tetraploidných pšeníc sa analyzovalo ešte 5 vzoriek *T. polonicum* L. Na lokuse Glu-A1 bola detekovaná alela 1 pri odrodách Mansholts White, Schliepkakes Riesen polonicum, Munchener, ktorá kladne ovplyvňuje technologickú kvalitu a pri odrodách Never Polnischer Weizen a Mirabella bola zistená nulová alela, ktorá má záporný vplyv. Na lokuse Glu-B1 pri štyroch odrodách (Never Polnischer Weizen, Mansholts White, Schliepkakes Riesen polonicum, Munchener) bola detekovaná alela 7 negatívne ovplyvňujúca pekárenskú kvalitu a pri kultivare Mirabella alela 6+8, ktorá kladne ovplyvňuje technologickú kvalitu zrna. Bodové Glu hodnotenie vypočítané na základe prítomnosti individuálnych HMW glutenínových podjednotiek dosiahla *T. polonicum* L. v priemere 3,2, čo zodpovedá pšenici s nízkou pekárenskou kvalitou.

Z analýzy tetraploidných pšeníc *T. turgidum* L. a *T. polonicum* L. vyplynulo, že ide o pšenice s nízkou technologickou kvalitou a sú vhodnejšie na špeciálne pekárenské výrobky.

Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že metodiku ISTA SDS-PAGE je možné odporučiť pre detekovanie HMW podjednotiek glutenínov, nakoľko jej rozlišovacia schopnosť v géli je dobrá, je relatívne rýchla a na základe elektroforeogramov možno identifikovať, charakterizovať a diferencovať nielen odrodu ako takú, ale aj niektoré jej vlastnosti.

Táto práca bola podporená grantom GA SR I/7648/20.

## LITERATÚRA

1. Payne P. I., Nightingale M. A., Krattiger A. F., Holt L. M.: J. Sci. Food Agric. 40, 51 (1987).
2. Kolster P., Krechting C. F., Van Gelder W. M. J.: J. Cereal. Sci. 15, 49 (1992).
3. Gregová E., Kraic J., Žák I.: *Biochemické, molekulárne a morfológické techniky v identifikácii odrôd rastlín*. str. 11. ÚKSÚP, Bratislava 1995.

## 17 NUTRIČNÝ A TECHNOLOGICKÝ PROFIL ODRÔD BREA, SOLARA, RÉGIA A SANA

ZDENKA GÁLOVÁ a HENRIETA KNOBLOCHOVÁ

Katedra biochémie a biotechnológia AF SPU, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

Pšenica je našou základnou obilninou, pričom jej kvalita sa hodnotí buď z hľadiska technologického alebo nutričného. Pšenica má vysokú dietetickú hodnotu a využíva sa ako surovina k výrobe celého radu dôležitých výrobkov.

Cieľom práce bolo porovnať štyri odrody pšenice letnej formy ozimnej Sanu, Solaru, Breu a Régia z hľadiska ich

kvality stanovením niektorých biochemických ukazovateľov. Vzorky zrna boli získané z poľného pokusu realizovaného vo vegetačnom období 1997/98 na experimentálnej báze KRV AF SPU v Nitre. Predplodinou bol hrach siaty. Výsevk činil 5 miliónov klíčivých zrn na hektár. Odrody zrna pšenice boli pestované na nehojenom variante. V celozrnom šrote vzoriek bol stanovený obsah hrubých bielkovín, jednotlivých frakcií bielkovín, aktivity niektorých hydrolytických enzýmov a zastúpenie HMW glutenínových podjednotiek (tab. I).

Z hľadiska produkcie z jednotky plochy sa analyzované materiály ukázali ako vysokoproduktívne, pričom výška úrody sa pohybovala od 6,92 t.ha<sup>-1</sup> (Brea) do 8,19 t.ha<sup>-1</sup> (Solara). Na základe obsahu hrubých bielkovín možno hodnotiť sledované odrody ako nízkobielkovinové, pričom obsah bielkovín pri všetkých odrodách bol do 8%. Uvedené výsledky potvrdzujú všeobecne známu negatívnu koleráciu medzi výškou úrody a jej kvalitou<sup>1</sup>.

Výživná a osivárska kvalita zrna pšenice je určovaná aktivitou hydrolytických enzýmov, ktoré zodpovedajú za rýchlosť klíčenia a v neposlednej miere podmieňujú aj technologickú kvalitu zrna. Dôležitú úlohu pri tomto majú najmä proteolytické a amylolytické enzýmy. Z výsledkov vyplýva, že analyzované odrody vykázali nízke hodnoty endoproteáz ako aj alfa-amyláz, čo je charakteristické pre plnú zrelosť zrna. Odroda Brea vykázala v porovnaní s ostatnými odrodami vyššiu aktivitu alfa-amylázy, z čoho vyplýva, že táto odroda je náchylnejšia na prerastanie zrna.

Cereálie dnes predstavujú najvýznamnejší zdroj bielkovín v potrave. Obsah a kvalita zásobných bielkovín pšeničného zrna sú hlavným faktorom, ktorý ovplyvňuje výživnú a technologickú kvalitu zrna pšenice. Podľa zastúpenia albumínov a globulínov možno hodnotiť odrodu Sanu ako vyslovene pšenicu určenú pre krmné účely. Rozhodujúcim ukazovateľom pre pekársku využitie zrna pšenice je obsah gliadínov a glutenínov, ktoré sa podieľajú na tvorbe lepku. Gliadíny vplyvajú na elasticitu, čiže pružnosť a pevnosť cesta a glutelíny na viskozitu, čiže rozťažnosť a rozplývavosť cesta. V tomto smere sa ako najlepšie pre mlynsko-pekárenské využitie ukázali odrody Brea, Régia a Solara. Gliadínové a glutenínové bielkoviny sa vyznačujú dostatočnou genetickou a jej zodpovedajúcou fenotypovou premenlivosťou, vysokou expresivitou a heritabilitou, v dôsledku ktorej sa kvalitatívna skladba jednotlivých zón elektroforetického spektra, ani ich kvantitaív-

Tabuľka I  
Niektoré ukazovatele zrna pšenice

Ukazovateľ	Odroda			
	Sana	Solara	Brea	Régia
Úroda [t.ha <sup>-1</sup> ]	7,65	8,19	6,92	7,90
Hrubé bielkoviny [%]	7,99	7,84	7,68	7,60
Alfa-amyláza [ukat.mg <sup>-1</sup> .10 <sup>-3</sup> ]	7,42	0,96	28,76	0,69
Endoproteázy [U.mg <sup>-1</sup> .10 <sup>-2</sup> ]	6,18	7,36	6,54	5,32
Albumíny+globulíny [%]	33,79	28,58	28,86	29,66
Gliadíny [%]	33,43	30,62	29,31	31,32
Gluteníny [%]	21,74	29,60	30,13	26,72
GLI+GLU [%]	55,17	60,22	59,44	58,04
Glu-score	5	7	7	9

na expresia nemení vplyvom agroekologických podmienok a možno ich teda využiť ako genetické markery technologickej kvality zrna pšenice<sup>2,4</sup>. Z elektroforeogramov vyplynulo, že v genóme zrna odrody Sana sú kódované HMW glutenínové podjednotky 0, 7+9, 2+12, kým pri odrodách Brea a Solara boli identifikované podjednotky 0, 7+9, 5+10 a pri odrode Régia 1, 7+9 a 5+10. Podľa zastúpenia jednotlivých HMW glutenínových podjednotiek je možné predikovať pekárskú kvalitu zrna pšenice vypočítaním tzv. Glu-score. V tomto smere vypočítané Glu-score pre Régiu (9), Solaru (7) a Brea (7) potvrdzuje dobrú technologickú kvalitu týchto materiálov. Glu hodnotenie 5 stanovené pre odrodu Sana dokumentuje jej zaradenie k typicky krmným pšeniciam.

Táto práca bola podoporená grantom GA SR I/7648/20.

## LITERATÚRA

1. Michalík I.: *Výživa a zdravie* 39 (8), 159 (1994).
2. Payne P. I., Lawrence G. J.: *Cereal Res. Commun.* 11, 29 (1983).
3. Payne P. I., Nightingale M. A., Krattiger A. F., Holt L. M.: *J. Sci. Food Agric.* 40, 51 (1987).
4. Rodriguez-Quijano M., Vázquez J. F., Carrillo J. M.: *J. Genet. Breed.* 44, 121 (1990).

## 18 PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ PRO VNESENÍ GENU BAKTERIÁLNÍ DIHYDROXYBIFENYL-DIOXYGENASY DO ROSTLIN

RADEK BOROVKA<sup>a</sup>, MIKLOS SZEKERES<sup>b</sup>, TOMÁŠ MACEK<sup>c</sup> a MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha, <sup>b</sup>Biologické výzkumné centrum Maďarské akademie věd, Szeged, Maďarsko, <sup>c</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha

Jedním z mnoha velkých problémů současnosti je zamoření životního prostředí polychlorovanými bifenylly (dále jen PCB). Jejich stopová množství byla nalezena dokonce v tkáňích mnoha živočichů, jež s nimi nikdy nepřišli do přímého kontaktu. U některých bakterií byly zjištěny schopnosti částečné či úplné degradace PCB. Je snahou tyto kmeny modifikovat, s následným cílem využití těchto kmenů k dekontaminaci životního prostředí<sup>1</sup>. S expanzivním rozvojem metod genetického inženýrství se mnoho projektů, jež byly ještě nedávno doménou genetiky mikroorganismů, začínají přesouvat do oblasti genetiky vyšších rostlin. Jejich výhodou oproti bakteriím je možnost snazší manipulovatelnosti, snazší kontrolovatelnost geneticky modifikované populace a v neposlední řadě také vstřícnější přijetí veřejností. Naši snahou bylo připravit rostliny se zvýšenou schopností degradovat PCB vnesením genu *bphC* pro 2,3-dihydroxybifenyldioxygenasu, která v bakteriích štěpí bifenylový kruh. Gen původně izolovaný z bakterie *Comamonas testosteroni* B356 a klonovaný do plazmidu pQE31 byl vyštěpen z plazmidu pQE31 a amplifikován. Byla přidána restriční místa pro SacI a XbaI (cit.<sup>2</sup>). Dále byly připraveny tři různé plazmidové konstrukty určené

k následnému přenosu do rostlinných buněk. Jako selekční marker k pozdější vizualizaci a lokalizaci v rostlinách byl využit gen kódující green fluorescent protein (GFP-4 a GFP-5). V plazmidu pBluescript SK(-) byly vytvořeny kazety s funkčním spojením *bphC-GFP*. Spojení bylo ověřeno sekvencí daného konstruktů a kazety byly vneseny do rostlinného vektoru pPCV 702. Tento vektor obsahuje silný rostlinný promotor CaMV35S (z viru kvěťákové mozaiky). Po transformaci bakterie *Agrobacterium tumefaciens* třemi různými vektory pPCV 702 obsahujícími gen *bphC* byly jednotlivě transformovány rostlinné disky *N. tabacum*. Po transformaci byly disky kultivovány na selektivní půdě s antibiotikem pro regeneraci pouze požadovaných transformantů.

Autoři děkují za finanční podporu projektu J19/98: 2232500003.

## LITERATURA

1. Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotechnol. Advances* 18, 23 (2000).
2. Borovka R., Szekeres M., Macek T., Kotrba P., Sylvestre M., Macková M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 243 (1998).

## 19 CADMIUM UPTAKE BY TRANSGENIC TOBACCO

TOMÁŠ MACEK<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>b</sup>, DANIELA PAVLÍKOVÁ<sup>c</sup>, JIŘINA SZÁKOVÁ<sup>c</sup>, MARTIN TRUKSA<sup>d</sup>, ANU SINGH CUNDY<sup>d</sup>, PAVEL KOTRBA<sup>b</sup>, NEIL YANCEY<sup>d</sup>, and WILLIAM H. SCOUTEN<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 10 Prague, <sup>b</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, ICT, 166 28 Prague, <sup>c</sup>Czech Agricultural University, 165 21, Czech Republic, <sup>d</sup>Biotechnological Center, Utah State University, 84322 Logan, UT, USA

Phytoremediation is already an accepted tool in removal of contaminants from the environment<sup>1</sup>. In the case of heavy metals the main requirement is high accumulation in plants, especially in the harvestable portion. About 400 metal-hyperaccumulating wild plants have been reported<sup>2</sup>, but their slow growth rate and limited yields impose limitations on the rate of heavy metal removal. By contrast, high-yield crops generally have low accumulation capabilities. Improvement of the above mentioned processes can be expected from construction of genetically modified plants tailored for phytoremediation purposes.

Plants have their own systems for binding of heavy metals<sup>3</sup>. The expression of the yeast metallothionein gene *CUP1* might improve the ability of a plant to tolerate or accumulate heavy metal ions<sup>4</sup>. We prepared transgenic plants with an additional metal binding domain introduced to the implemented protein to further enhance the metal binding capacity and the efficiency of the process

For this reason gene coding a peptide of 6 histidine moie-



ties has been isolated from a commercial plasmid pTrc-HisA, cloned in *E. coli* into plasmid pBI121. The polyHis gene was combined either with *CUP1* or *GUS* genes. Electroporated into *Agrobacterium* strain LBA4404 the constructs were used for transformation of tobacco leaf discs (*Nicotiana tabacum* Wisconsin 38).

The screening test of Cd accumulation by plants was conducted on sand media with addition of Knop's nutrient solution modified by addition of cadmium ( $0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  as  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ). The plants cultivated during the elongation growth period were harvested after 6 weeks of growth. Cd in plant biomass was determined by AAS (Varian SpectraAA-40) after dry ashing of the samples.

The results show that while control WSC-38 whole plants accumulated Cd in average  $26.4 \text{ mg.kg}^{-1}$  (17.7 in above-ground parts, 8.7 in the roots), CUP1 yeast metallothionein gene did not increase the accumulation above the average of controls (20.8 total, 12.2 above-ground, 8.6 in roots). The His-CUP construct proved to have positive effect on Cd accumulation (in average 34 total, 27 above ground, 9 in roots), the clone X-HisCUP accumulating by 77 % more Cd in above-ground parts comparing to the non-transformed controls ( $41.9 \text{ mg.kg}^{-1}$  total,  $31.3 \text{ mg.kg}^{-1}$  above-ground,  $10.6 \text{ mg.kg}^{-1}$  in roots).

*This work was supported by internal grant of Utah State University Biotechnology Center, Logan, UT, USA.*

#### REFERENCES

1. Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotech. Advances* 19, 23 (2000).
2. Baker A. J. M., Brooks R. R.: *Biorecovery* 1, 81 (1989).
3. Kotrba P., Macek T., Ruml T.: *Collect. Czech Chem. Comm.* 64, 1057 (1999).
4. Truksa M., Singh-Cundy A., Macek T., Kotrba P., Macková M., Yancey N., Scouten W. H.: *Chem. Listy* 90, 582 (1996).

#### 20 VLIV PŘÍDAVKU ČISTÍRENSKÉHO KALU NA KUMULACI KADMIA V ROSTLINÁCH ŠPENÁTU

DANIELA PAVLÍKOVÁ<sup>a</sup>, MILAN PAVLÍK<sup>b</sup>,  
SOŇA VAŠÍČKOVÁ<sup>b</sup>, PAVEL TLUSTOŠ<sup>a</sup>,  
JIŘINA SZÁKOVÁ<sup>a</sup>, KAREL VOKÁČ<sup>b</sup> a JIŘÍ BALÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze, 165 21 Praha 6, <sup>b</sup>ÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Mezi rizikové prvky s vysokou mobilitou a poměrně snadným transferem do rostlin je řazeno kadmium, na jehož kumulaci v rostlinách špenátu po aplikaci čistírenského kalu je zaměřena tato práce.

Vliv aplikace čistírenského kalu na kumulaci kadmia v rostlinách špenátu byl sledován v modelovém nádobovém pokusu. K pokusu byly použity dvě zeminy – černozem a fluvizem – s odlišnými fyzikálně chemickými vlastnostmi a odlišným obsahem Cd. Do nádob bylo přidáváno 160,1 g čerstvého čistírenského kalu (s obsahem sušiny 20,8 %) s celkovým obsahem Cd  $6,09 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Obsah Cd v rostlinách, obou zemi-

nách i v kalu byl stanoven AAS (Varian SpectraAA-400). Dále byla postupně provedena extrakce suché biomasy špenátu methanolem, petroletherem, acetonem a směsí methanol+H<sub>2</sub>O+HCOOH (47,5+47,5+5; v/v/v). Ve spojených frakcích petrolether a aceton a frakci methanol+H<sub>2</sub>O+HCOOH bylo stanoveno Cd metodou bezplamenové AAS (Varian SpectraAA-400 s grafitovým atomizátorem GTA-96). U frakce methanol+H<sub>2</sub>O+HCOOH bylo změřeno IČ spektrum.

Porovnáme-li obsah Cd v rostlině na kontrolních variantách bez čistírenského kalu, je zřejmé, že jeho příjem byl ovlivněn především přijatelným podílem kadmia v půdě. Nárůst obsahu Cd v biomase špenátu po aplikaci čistírenského kalu byl na obou zeminách přibližně trojnásobný. Při extrakci methanol + H<sub>2</sub>O+ HCOOH se uvolnila barevná složka neextrahovatelná methanolem. Tyto látky s dvojnými vazbami v konjugaci, které odpovídají za barevnost frakcí, nebyly na IČ spektru detegovány. Velkou část vzorku tvořily, jak vyplývá z IČ spekter, soli organických kyselin ( $\nu_{\text{COO}^-}$  1605 nebo 1600, 1384 nebo 1385  $\text{cm}^{-1}$ ), pravděpodobně soli kyseliny mravenčí nebo šťavelové. Soli kyseliny mravenčí mohly vzniknout reakcí mezi kationty uvolněnými kyselinou obsaženou v elučním činidle z biomasy špenátu. Současně byl v tomto extraktu stanoven obsah Cd a zjištěná koncentrace odpovídal 12 % z celkového množství stanoveného v biomase špenátu.

*Tato práce byla podpořena grantem GA ČR 526/97/0845.*

#### 21 TKÁŇOVÉ KULTURY VYŠŠÍCH ROSTLIN – MODEL PRO STUDIUM ENZYMATICKÉ DEGRADACE VÝBUŠNIN

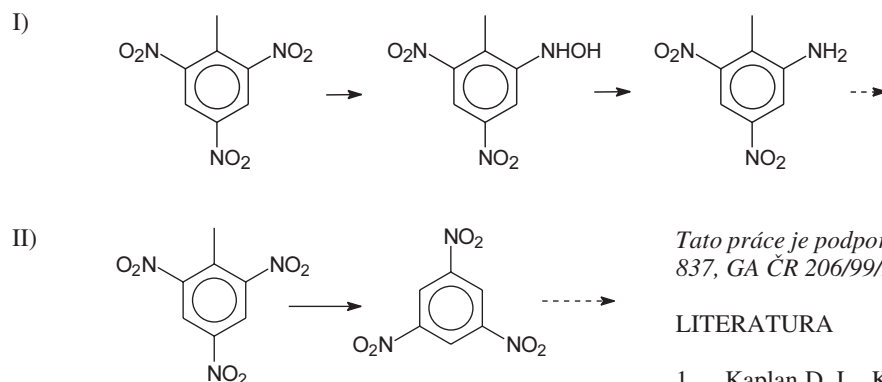
ALEŠ NEPOVÍM<sup>a</sup>, SVATOPLUK ZEMAN<sup>b</sup>,  
a TOMÁŠ VANĚK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Oddělení rostlinných explantátů, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Katedra teorie a technologie výbušnin, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice

K jedné z rizikových skupin syntetických organických látek náleží i aromatické nitrosloučeny, které jsou používány k výrobě výbušnin, barviv a pesticidů. Nejznámější představitel skupiny látek používané jako výbušniny patří 2,4,6-trinitrotoluen (komerčně známý pod názvem „tritol“, zkr. TNT), který byl po desetiletí jednou z nejpoužívanějších výbušnin. S výrobou a s jeho další manipulací docházelo a dochází k úniku TNT látky do okolního prostředí. TNT představuje zdroj vysoce toxické nebezpečné látky, která způsobuje anemii, poškozují játra a je potenciálním lidským karcinogenem<sup>1-3</sup>. Alternativním způsobem detoxikace nitroaromatických látek je jejich fyto-remediace, tj. pomocí rostlin jejich konverze na méně toxické formy, které jsou transportovány do různých buněčných organel, kde mohou být zabudovány v inaktivní formě<sup>4</sup>.

Kultivace rostlin *in vitro* podmínkách umožňuje sledovat účinek xenobiotika na rostlinu nezávisle na účinku ostatních mikroorganismů, proto byly ke studiu degradace TNT použity suspenzní kultury druhů *Solanum aviculare* a *Rheum palmatum*. TNT bylo degradováno hrubým extraktem z obou rost-





Obr. 1. Schéma základních cest degradace TNT v hrubém extraktu, I) redukce, II) oxidace

linných druhů a analýzou produktů degradace byly podle předběžných výsledků zjištěny dvě zásadní cesty degradace. Při pH 9 byla v reakční směsi zjištěna oxidace methylové skupiny TNT na trinitrobenzen, zatímco při pH 7 v přítomnosti kofaktoru NADH byla detegována zvýšená koncentrace hydroxyaminodinitrotoluenu, který je následným produktem redukce TNT (obr. 1).

Tato práce je podporována z prostředků poskytnutých: COST 837, GA ČR 206/99/P034 a 206/99/1252

#### LITERATURA

1. Kaplan D. L., Kaplan A. M.: Environ. Sci. Technol. 16, 566 (1982).
2. Hartter D. R., v: *Toxicity of Nitroaromatic Compounds (Chemical Industry Institute of Toxicological Series)* (Rickert D. E., ed.), str. 1. Hemisphere Publishing Corporation, New York 1985.
3. Hathaway J. A. v: *Toxicity of Nitroaromatic Compounds (Chemical Industry Institute of Toxicological Series)* (Rickert D. E., ed.), str. 262. Hemisphere Publishing Corporation, New York 1985.
4. Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M. A., Davies T. G. E.: Trend Plant Sci. 2, 144 (1997).

**01 FAMILIAL JUVENILE HYPERURICEMIC NEPHROPATHY (FJHN): LOCALIZATION OF THE GENE ON CHROMOSOME 16p11.2 AND EVIDENCE FOR GENETIC HETEROGENEITY**

BLANKA STIBŮRKOVÁ<sup>a</sup>, J. MAJEWSKI<sup>b</sup>,  
IVAN ŠEBESTA<sup>a,c</sup>, W. ZHANG<sup>b</sup>, J. OTT<sup>b</sup>,  
and STANISLAV KMOCH<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute for Inherited Metabolic Disorders and* <sup>c</sup>*Department of Clinical Biochemistry, 1<sup>st</sup> School of Medicine and General Faculty Hospital Prague,* <sup>b</sup>*Laboratory of Statistical Genetics, Rockefeller University, New York*

Familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (FJHN), is an autosomal dominant renal disease characterized by juvenile onset of hyperuricemia, gouty arthritis and progressive renal failure at an early age. Using a genomewide linkage analysis in three Czech affected families we have identified a locus for FJHN on chromosome 16p11.2 and found evidence for genetic heterogeneity and reduced penetrance of the disease. Maximum two point HLOD score of 4.70 was obtained at a recombination fraction  $\theta = 0$  with marker D16S3036; multipoint linkage analysis yielded a maximum HLOD score of 4.76 at the same location. Haplotype analysis defined a 10 cM candidate region between flanking markers D16S501 and D16S3113 exhibiting crossover events with the disease locus. Recent publication on localization of the FJHN gene to the same region<sup>1</sup> and our results<sup>2</sup> narrow 1.7 cM candidate region, between markers D16S403 and D16S3113. This genomic region contains several genes expressed in the kidney, one of which, NADP-regulated thyroid-hormone binding protein is currently being analysed.

*This work is supported by grant M27/3 from IGA MZČR.*

REFERENCES

1. Kamatani, et al.: *Arthritis Rheum.* 43, 925 (2000).
2. Stibůrková B., et al.: *Am. J. Human. Gen.*, in press.

**02 LINK BETWEEN A NOVEL HUMAN  $\gamma$ D-CRYSTALLIN ALLELE AND A UNIQUE CATARACT PHENOTYPE EXPLAINED BY PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY**

STANISLAV KMOCH<sup>a</sup>, JIŘÍ BRYNDA<sup>b</sup>,  
BEFEKADU AWSAV<sup>b</sup>, KAREL BEZOUŠKA<sup>c</sup>,  
PETR NOVÁK<sup>d</sup>, PAVLÍNA ŘEZÁČOVÁ<sup>b</sup>,  
LENKA ONDROVÁ<sup>a</sup>, MARTIN FILIPEČ<sup>e</sup>,  
JURAJ SEDLÁČEK<sup>b</sup>, and MILAN ELLEDER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Inherited Metabolic Diseases,* <sup>e</sup>*Ophthalmologic Clinic, Charles University, 1st Faculty of Medicine and University Hospital,* <sup>c</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,* <sup>b</sup>*Department of Gene Manipulation, Institute of Molecular Genetics, and* <sup>d</sup>*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic*

We describe a 5-year old boy with unique congenital cataract caused by deposition of numerous birefringent, plei-

ochronic, macroscopically prismatic crystals. Crystal analysis with subsequent automatic Edman degradation and MALDI-TOF mass spectrometry have identified the crystal-forming protein as  $\gamma$ D-crystallin (CRYGD) lacking the N-terminal methionine. Sequencing of the CRYGD gene has shown a heterozygous C→A transversion in the position 109 of the inferred cDNA (36R→S) of the processed, N-terminal methionine lacking CRYGD. The lens protein crystals were X-ray diffracting, and our crystal structure solution at 2.25 Å suggests that mutant R36S CRYGD has an unaltered protein fold. In contrast, the observed crystal packing is possible only with the mutant protein molecules that lack the bulky arginine-36 side chain. This is the first described case of human cataract caused by crystallisation of a protein in the lens. It involves the third known mutation in the CRYGD gene but offers for the first time a causative explanation of the phenotype.

**03 NEONATAL OLFACTORY BULBECTOMY OF RATS: ODOR INDUCED FOS-LIKE IMMUNOREACTIVITY IN OLFACTORY RELATED STRUCTURES**

JUDITA ORENDÁČOVÁ<sup>a</sup>, LUBOMÍR RAČEK<sup>b</sup>,  
and MARCELA MARTONČÍKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Neurobiology, SAS, Šoltésovej 4, 040 01 Košice,* <sup>b</sup>*Institute of Animals Physiology, SAS, Šoltésovej 4, 040 01, Košice, Slovakia*

The proto-oncogene *c-fos* belongs to a large class of immediate early genes<sup>1</sup> which are induced rapidly, within minutes, by sensory stimuli<sup>2</sup>. The protein product of the *c-fos* gene, Fos, is induced in transsynaptically activated neurons<sup>3</sup>. The synaptic circuitry of the accessory olfactory bulb and main olfactory bulb are similar<sup>4</sup>. Mitral cells receive afferents from the vomeronasal nerve and project via the corticomedial amygdala to hypothalamic nuclei, forming the excitatory pathway for olfactory signals received by the vomeronasal organ receptors<sup>5</sup>. The mitral cells form reciprocal dendrodendritic synapses with granule cells, the main class of interneuron in the accessory olfactory bulb. Depolarization of these synapses due to mitral cell activity results in the release of GABA back on the mitral cell dendrites. This feedback inhibition at the reciprocal synapses regulates mitral cell activity.

When the olfactory bulb (OB) is removed olfactory epithelial cells continue to differentiate, mature, and potentially send their axons into the central nervous system (CNS) in attempt to repair the system<sup>6</sup>. This is an age-dependent process. Following neonatal olfactory bulbectomy the newly developed olfactory nerve fibres penetrate into the forebrain and form ectopic, glomerular-like structures in this unconventional area<sup>7</sup>. After an adult ablation, the olfactory nerve fails to penetrate into the CNS and behavioral recovery does not occur<sup>8</sup>. Main OB and accessory OB send a complex set of projections to a broad cortical sheet, which is composed of several distinct areas, collectively referred as the olfactory cortex. The largest area of the mammalian olfactory cortex is the piriform cortex, which receives direct projections from the OB via lateral olfactory tract. Various lesions involving the OB can affect the normal anatomical arrangement of bulbo-

-cortical projections. Recently it was demonstrated that subventricular zone (SVZ) cells continue to proliferate in the brain of adult rodents. The newly generated progenitor cells, migrate through rostral migratory stream (RMS) to the OB where they differentiate into granular and periglomerular neurons<sup>9</sup>. The role the stem cells play during development is still clear but their role in adult brain as well as in injured CNS remains unknown and could add a new dimension to our understanding of neuroplasticity.

Immediate early gene expression is not a marker for neuronal activity *per se* as there are many examples in which neuronal depolarization does not lead to their expression. A common feature of the physiological system studied is that immediate early gene expression is associated with circumstances which results in long-lasting changes in neuronal function. Functional recovery of rats and presence of ectopic glomerular structures in different brain regions on the neonatally bulbectomized side<sup>10</sup> we considered as a great challenge for mapping Fos immunoreactive neurons in the reconstituted olfactory projections.

Neonatal (P3-P5) Wistar albino rats were anaesthetized by hypothermia and their right OB gently removed by suction and animals survive for five months. Two hours before put the animals to death they have been exposed to odorized air. After that perfusion fixation by 4 % paraformaldehyde followed. The brain was removed, postfixed and cryoprotected overnight. Sagittal 50 µm thick sections were cut and every fifth section processed for Fos-like immunoreactivity<sup>11</sup>. An orthomorphology was made on the alternate sections stained by Gill's hematoxyline. The frontal lobe of the operated side extended rostrally to fill the space created by removal of OB and its general cytoarchitecture was quite distorted. Glomeruli-like structures were seen in the rostral frontal cortex and in olfactory peduncle. In some cases the reconstituted olfactory nerve penetrated as far as to the olfactory cortex and SVZ. Cells expressing Fos were distributed in the periglomerular position of ectopic glomeruli located on basal surface of frontal cortex. This finding indicates that periglomerular cells of these newly-formed glomeruli received direct synaptic inputs from olfactory receptor neurons. In spite of fact that anatomical relationships in frontal lobe of the operated side were changed we find Fos-labelled cells also in places which agree with paraolfactorial areas, olfactory tubercle, olfactory-cortical tract and piriform cortex of control animals.

Further Fos-immunoreactivity studies correlated with electron microscopical examination of ectopic glomeruli should elucidate if/where the olfactory nerve is making synaptic contacts. In order to determine relation between anatomical and functional recovery after neonatal bulbectomy each animal have to be tested behaviourally.

*This work was financially supported by the VEGA Grants No. 2/7235/20 and 2/6108/99.*

#### REFERENCES

1. Morgan J. I., Carrant T.: Trends Neurosci. 12, 459 (1989).
2. Hunt S. P., Pini A., Even G.: Nature 328, 632 (1987).
3. Menétrey D., Grannon A., Levine J. D., Basbaum A. I.: J. Comp. Neurol. 285, 153 (1989).
4. Mori K.: Prog. Neurobiol. 30, 275 (1987).
5. Li C. S., Kaba H., Saito H., Seto K.: Neuroscience 29, 201 (1989).
6. Graziadei P. P. C., Levine R. R., Monti Graziadei G. A.: J. Cell Biol. 59, 525 (1984).
7. Graziadei P. P. C., Monti Graziadei G. A., in: *Neuronal Plasticity* (Cotman C. W., ed.), p. 131. Raven Press, New York 1978.
8. Račková E., Vanický I., Žigová T.: Int. J. Neurosci. 79, 13 (1994).
9. Lois C., Alvarez-Buylla A.: Science 264, 1145 (1994).
10. Račková E., Čížková D., Sekerková G.: Biológia (Bratislava) 52, 789 (1997).
11. Hsu S. M., Raine L., Fanger H.: J. Histochem. Cytochem. 29, 577 (1981).

#### 04 OLFACTORY BULBECTOMY OF NEONATAL RATS INFLUENCES PROLIFERATION OF SUBVENTRICULAR ZONE NEURONAL PRECURSORS

ENIKO RAČEKOVÁ<sup>a</sup>, LUBOMÍR RAČEK<sup>b</sup>,  
and JUDITA ORENDÁČOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Neurobiology, and* <sup>b</sup>*Institute of Animals Physiology, SAS, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, Slovak Republic*

The olfactory system is an excellent model for studying anatomical and functional recovery after brain injury. The olfactory sensory neurons can be replaced after destruction, and the newly formed neurons can innervate the lesioned olfactory bulb (OB) or other non-specific target<sup>1</sup>. Moreover, olfactory bulbs retain the ability to acquire new neurones throughout life<sup>2</sup>. Neuronal precursors are born in the subventricular zone (SVZ) of the neonatal and adult rodent brain and migrate through the rostral migratory stream (RMS) to the olfactory bulb where they differentiate into interneurons of the granule cell layer and periglomerular region<sup>3</sup>. The results of studies testing the role of the OB in the migration and proliferation of SVZ precursors are not in complete agreement. One study<sup>4</sup> suggest that olfactory deprivation by naris closure does not influence production of new interneurons from the SVZ. Another study using the naris occlusion model, however, reported reductions in the numbers of proliferating cells in the subependymal layer of the OB itself and in the RMS just caudal to the OB (Ref.<sup>5</sup>).

In our experiment we intended to test whether neonatal olfactory bulbectomy affects the proliferation, migration and survival of SVZ-derived progenitors. Neonatal (P3-P5) Wistar albino rats were anaesthetised by hypothermia and the right OB was exposed and then gently removed by suction. The bulbectomized animals were allowed to survive for 5 months. To label proliferating SVZ cells, the rats received an intraperitoneal injection of the cell proliferation marker BrdU (50 mg.kg<sup>-1</sup> body weight; Sigma, St. Louis, MO). Four hours after the BrdU injection the animals were perfused transcardially with 4 % paraformaldehyde. The brains were serially sectioned at 24 mm in the sagittal plane and processed for BrdU immunohistochemistry. Alternate series of sections were stained with Gill's hematoxylin. Every third BrdU labelled section, which included the RMS, was chosen for image analysis and quantification.

By 5 months after bullectomy, the frontal pole of the cortex extended rostrally to fill the space created by the removal of the OB. The rostral end of the lateral ventricle and the genu of the corpus callosum were also greatly displaced. The general cytoarchitecture of the protruded frontal lobe was quite distorted. Histological examination revealed the presence of ectopic glomerular structures in the frontal cortex, olfactory peduncle, and in some cases also in the olfactory cortex and SVZ. We measured the volume of the SVZ and RMS in the bullectomized hemisphere and compared it with those in the contralateral non-operated side. Following bullectomy, the ipsilateral subventricular zone and rostral migratory stream persisted and increased in volume, indicating that many more cells survive when the bulb is absent. Rostral migration of precursors along the RMS also continued. The proportion of dividing BrdU-labelled cells in the RMS of the bullectomized side was significantly changed in comparison with the contralateral hemisphere.

In a similar experimental paradigm<sup>6</sup> the effect of adult mice bullectomy was studied on SVZ cells proliferation and migration. Our results provide support for these data that factors regulating the rate of progenitor cell production and migration of cells are intrinsic to the SVZ and RMS, and not controlled by the OB.

In summary, the results of the present study support two conclusions. In neonatally bullectomized rats the olfactory nerve is able to penetrate into several forebrain structures. Subventricular zone neuronal precursors continue to divide and migrate in the absence of the olfactory bulb. Whether the neurogenic capacity of the SVZ has an effect on the acceptance of the reconstituted olfactory fibres after bullectomy needs to be considered in our future study.

*This work was financially supported by the VEGA Grants No. 2/7235/20 and 2/6108/99.*

#### REFERENCES

1. Graziadei P. C., Levine R. R., Monti Graziadei G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5230 (1978).
2. Altman J.: *J. Comp. Neurol.* 137, 443 (1969).
3. Lois C., Alvarez-Buylla A.: *Science* 264, 1145 (1994).
4. Frazier-Cierpial L., Brunjes P. C.: *J. Comp. Neurol.* 289, 481 (1989).
5. Corotto F. S., Henegar J. R., Maruniak J. A.: *Neuroscience* 61, 739 (1994).
6. Kirschenbaum B., Doetsch F., Lois C., Alvarez-Buylla A.: *J. Neurosci.* 19, 2171 (1999).

#### 05 METABOLICKÉ ZMĚNY MYOKARDU HYPERTRIGLYCERIDEMICKÝCH POTKANŮ VYVOLANÉ n-3 MASTNÝMI KYSELINAMI

MILADA TUTTEROVÁ, HANA VAVŘÍNKOVÁ,  
LUDMILA KAZDOVÁ a JANA DIVIŠOVÁ

*Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9,  
140 21 Praha 4*

Zvýšený příjem polynenasycených n-3 mastných kyselin (MK) může vedle hypolipidemického účinku ovlivňovat slo-

žení buněčných membrán, tím i vlastnosti a funkci receptorů, enzymatických aktivit a průběh některých metabolických dějů. Doposud však není dostatek informací jakým způsobem přívod n-3 MK ovlivňuje metabolické pochody přímo v srdci. Na izolovaném srdci hypertriglyceridemických samců potkanů (HTG) jsme sledovali změny v utilizaci triacylglycerolů (TG) a glukosy (G) podle inkorporace <sup>14</sup>C-glukosy do CO<sub>2</sub> a glykogenu. U HTG skupiny byla tvorba TG potencována vysokosacharosovou dietou (70 kal%) s 10 váh% sádla (HTG/S) nebo rybího oleje (HTG/RO) po 21 dnů. Kontrolní skupinou (K) byli potkani kmene Wistar krmení standardní dietou. Srdce byla promývána 30 min. médiem s 5,5 mmol.l<sup>-1</sup> G a s <sup>14</sup>C-U-glukosou (2.10<sup>-5</sup> dpm.μmol<sup>-1</sup>). Utilizaci endogenních TG jsme určovali podle jejich poklesu v srdci během perfuze. MK fosfolipidů byly stanoveny plynovou chromatografií a malondialdehyd (MDA) reakcí s kyselinou thiobarbiturovou.

Přívod n-3 MK normalizoval sérové TG ze 7,07±0,45 na 1,31±0,21 mmol.l<sup>-1</sup> a snížil neesterifikované MK (NEMK) z 1,87±0,43 na 0,83±0,05 mmol.l<sup>-1</sup>. Glykemie nebyla dietou ovlivněna. Relativní hmotnost epid. tukového tělesa byla vlivem n-3 MK snížena (p<0,01). U srdce HTG linie byla hmotnost nezávisle na dietě naopak vyšší (p<0,01) než u K potkanů nezávisle na dietě. Z hemodynamických parametrů jsme pozorovali pouze snížení koronárního průtoku u HTG potkanů (10,1±0,46 a 9,1±0,53 vs 11,3±0,60 ml.g<sup>-1</sup> v.v.). Obsah TG na počátku perfuze u HTG/S srdcí byl 30,6±2,4 a u HTG/FO skupiny 20,2±2,7 oproti K skupině (11,8±0,9 μmol.g<sup>-1</sup> s.v.). Na konci perfuze se obsah TG snížil ve všech skupinách na podobnou úroveň. Nicméně snížení TG u skupiny HTG/S bylo dvojnásobné (13,6) oproti HTG/RO (6,5 mmol.g<sup>-1</sup> s.v.). Inkorporace <sup>14</sup>C z G do CO<sub>2</sub> nebyla ovlivněna dietou na rozdíl od glykogenu, kde byla vlivem sacharosové diety zvýšena z kontrolních hodnot 5,0±1,0 na 16,5±4,1 a 15,5±3,0 dpm.g<sup>-1</sup> s.v.10<sup>5</sup> u HTG skupin nezávisle na typu tuku. Obsah glykogenu v srdci u HTG skupin nebyl rozdílný avšak zvýšila se jeho specifická aktivita. Vlivem RO se změnilo složení MK fosfolipidů membrán. Poměr n-3/n-6 se z 0,46 zvýšil na 1,33. Obsah MDA v srdci ve všech skupinách nebyl významně rozdílný.

Zvýšený přívod n-3 MK výrazně ovlivnil metabolismus TG. V séru HTG potkanů došlo k normalizaci TG, NEMK a k menšímu ukládání TG do depotního tuku a do srdce. Hypolipidemický efekt n-3 MK je vysvětlován sníženou lipogeneosou a sekrecí lipoproteinů z jater<sup>1</sup>. n-3 MK mohou také působit jako aktivátory PPAR a zvyšovat oxidaci MK. Zvýšení oxidace jsme prokázali v srdcích HTG/RO potkanů během reperfuze pomocí měření radikálových forem mitochondriálního dýchacího řetězce za použití ESR (cit.<sup>2</sup>). Za podobné situace bylo srdce HTG/RO potkanů méně zatíženo akumulací TG než srdce skupiny HTG/S. Na druhé straně přívod n-3 MK neovlivnil utilizaci glukosy ani obsah a obrat glykogenu.

#### LITERATURA

1. Nestel O. J.: *Ann. Rev. Nutr.* 10, 149 (1990).
2. Vavřínková H., Tutterová M., Stopka P.: *Proc. European Meeting of International Soc. for Heart Res.*, str. 649 (1994).



## 06 EFFECT OF HYPOTHYREOSIS TREATMENT ON NEUROSTEROIDS AND HOMOCYSTEINE LEVELS

JAROSLAVA TALLOVÁ<sup>a</sup>, MARIE BIČÍKOVÁ<sup>b</sup>,  
MARTIN HILL<sup>b</sup>, JOSEF TOMANDL<sup>a</sup>,  
and ANTON VAŇUGA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, 662 43 Brno, <sup>b</sup>Institute of Endocrinology, 116 94 Prague, Czech Republic, <sup>c</sup>Institute of Endocrinology, 034 91 Lubochňa, Slovak Republic

Autoimmune thyroiditis with hypothyroidism is frequently accompanied with the symptoms of psychological disorders and changes in lipid metabolism leading to atherogenic abnormalities. Recent studies suggest that some neurosteroids<sup>1</sup> and homocysteine<sup>2</sup> are involved in the pathophysiology of both mentioned disorders. Homocysteine metabolism may be affected by some steroids<sup>3</sup>. We were interested if the treatment of hypothyroidism does have some effect on the above mentioned factors.

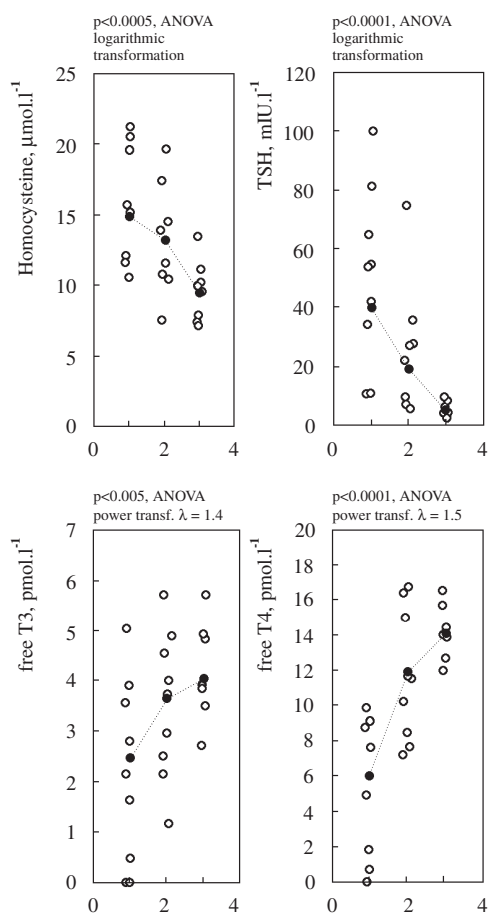


Fig. 1. Concentrations of homocysteine, TSH, free T3 and free T4 during the treatment of hypothyreosis. The numbers on the x-axis represent the months elapsed from the start of the treatment. The full circles with whiskers represent the retransformed group means with their 95 % confidence intervals. The empty circles symbolize the experimental points

We studied plasma concentrations of allopregnanolone, pregnenolone sulfate, dehydroepiandrosterone and its sulfate, progesterone, estradiol and homocysteine in 15 patients (13 women, 2 men) from the first visit of a physician and during the three months' treatment by levothyroxine. The steroids and homocysteine levels were compared with those characterising the thyroidal status (TSH,  $\text{fT}_3$ ,  $\text{fT}_4$  and antibody levels ATM and ATG). The results were evaluated by two factor ANOVA (Fig. 1) followed by factor analysis and Spearman's correlations.

We have found a positive correlation between homocysteine and TSH and a negative correlation between homocysteine and  $\text{fT}_3$  and  $\text{fT}_4$ . The steroids correlated negatively with the levels of antibodies ATM.

The study was supported by the grant No. 4844 and 5398 of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

## REFERENCES

1. Robel P., Schumacher M., Baulieu E. E.: Neurosteroids 21, 1 (1999).
2. Tonstad S.: Eur. J. Clin. Invest. 27, 1025 (1997).
3. Kim M. H., Kim E., Passen E. L., Meyer J., Kang S. S.: Metabolism 46, 247 (1997).

## 07 THE MEASUREMENT OF TOTAL HOMOCYSTEINE AND RELATED THIOLS IN BREAST CYST FLUID

JOSEF TOMANDL<sup>a</sup>, JAROSLAVA TALLOVÁ<sup>a</sup>,  
and MARTA ŠIMÍČKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, 662 43 Brno, <sup>b</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic

Homocysteine, a thiol-containing amino acid, is the demethylated derivative of the essential amino acid methionine. An increased homocysteine level may reflect a disturbance of the methionine metabolism. Mild hyperhomocysteinemia was reported in cases of different cancer disease. Breast cancer cells secrete a higher amount of homocysteine in *in vitro* experiments<sup>1</sup>. The presence of homocysteine was also found in ovarian cyst fluid<sup>2</sup>.

The measuring of cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) in breast cyst fluid allows the categorization of cysts into two major subsets (type I and type II) that are associated with a different risk of later developing cancer. Breast cancer develops mainly in those women whose cyst fluid shows a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio lower than 4.0 (cyst type I)<sup>3</sup>. The fluid filling the cysts contains apart from other things unusual amounts of thiols. There have been many reports of the separation and measurement of methionine and glutathione metabolites in plasma but not in cyst fluid samples.

The objective of this study was to assess and develop a method to determine the cyst total thiol levels by using HPLC and subsequently compare the concentrations of thiols in both cyst types. Tributylphosphine was used for the reduction of thiols and ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazo-4-sulfonate (SBD-F) was used as the derivatization agent.

The separation was performed on the reversed-phase column (Luna C18, 250×4.6 mm, 5 μm) using a linear gradient elution with the mobile phase containing 0.1 mol.l<sup>-1</sup> potassium phosphate buffer (pH 6.0) and acetonitrile (100:1.5 and 100:10, v/v) at a flow rate 1 ml.min<sup>-1</sup>. The method exhibited linearity in the range sufficient for accurate determination of all followed thiols and was assessed to be sensitive, reliable a reproducible for this purpose.

The breast cyst samples were divided according to the distribution of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio into two groups; type I (n = 10) and type II (n = 4). Besides total homocysteine were measured total cysteine, cysteinylglycine and glutathione concentrations in breast cyst fluid. The concentration of homocysteine in the cyst type I was significantly different compared to the cyst type II (p < 0.01). We have found significant correlations between homocysteine and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> concentration ratio, glutathione, cysteinylglycine and the glutathione/cysteine ratio (Spearman  $r_s = -0.97$ ,  $p = 0.03$ ;  $r_s = 0.96$ ,  $p = 0.04$ ;  $r_s = 0.96$ ,  $p = 0.04$  and  $r_s = 0.99$ ,  $p = 0.006$ , respectively) in the cyst type I. We have found no significant correlations in the cyst type II.

To our knowledge this is the first report about homocysteine and related thiols in breast cyst fluids. Our finding requires further investigation to support the hypothesis, that hyperhomocysteinemia could be a possible predictor or promotor of breast cancer development.

#### REFERENCES

1. Cramer D. A.: *Laboratory Medicine* 29, 410 (1998).
2. Corona G., Toffoli G., Fabris M., Viel A., Zarrelli A., Donada C., Boiocchi M.: *Eur. J. Cancer* 33, 1284 (1997).
3. Šimíčková M., Pecan L., Eben K., Nekulová M., Vermousek I., Stratil P., Rejthar A., Černoch M., Lang B., Sakalová J.: *Neoplasma* 41, 5 (1994).

#### 08 PSEUDORABIES GROWTH FACTOR – NEW INFORMATION ABOUT ITS PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

IGOR KONVALINA<sup>a</sup>, FRANTIŠEK GOLAIS<sup>b</sup>,  
VLADIMÍR PÄTOPRSTÝ<sup>c</sup>, JÁN LEŠKO<sup>d</sup>,  
and JURAJ GAŠPERÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská 21, 842 51 Bratislava,* <sup>b</sup>*Department of Microbiology and Virology, Faculty of Natural Sciences of Comenius University, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava,* <sup>c</sup>*Institute of Chemistry, and* <sup>d</sup>*Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 842 46 Bratislava, Slovak Republic*

Mammalian cells infected by several herpesviruses produce, under non-permissive conditions, into the cultivation media trace amounts of the extracellular growth factors.

These novel factors, associated with herpesviruses, have been shown to have two effects on *in vitro* cultured cells. While the normal non-transformed cells cultivated in presence of herpes virus related growth factors acquired the appearance of transformed cells ("criss-cross" pattern of growth, the loss of

contact inhibition, colonies in soft agar), the phenotype of cancer cells *in vitro* was repressed<sup>1</sup>. The various growth factors can be resolved in process of purification into two or three biological active components<sup>2</sup>.

From the group of growth factors associated with 10 different herpesviruses, the most interesting is the pseudorabies growth factor – PRGF, namely its component A. This growth factor shows a broad spectrum of biological activities (manifested even in concentration range 10<sup>-12</sup>–10<sup>-18</sup> g.l<sup>-1</sup>) like: 1) daily weight increment of newly-born mice and rats up to 200 % in comparison to the control<sup>3</sup>; 2) the dual effect on the cytoskeleton in normal human and transformed HeLa cells<sup>4</sup>; 3) the enhancement of multiplication and progesterone production in granulosa cells<sup>5</sup>.

In our latest experiments we have observed that: 1) the transforming activity of PRGF component A can be neutralized by one from the 26 antibodies directed against glycoprotein B of pseudorabies virus; 2) the process of transformation of normal cells under influence of PRGF<sub>A</sub> is very rapid; it is finished within one minute; 3) on maize corns it was detected that PRGF<sub>A</sub> (tested in the concentration range 10<sup>-8</sup> g.l<sup>-1</sup> to 10<sup>-18</sup> g.l<sup>-1</sup>) stimulated also the growth of plants. Maximal stimulation was observed at concentration 10<sup>-15</sup> g.l<sup>-1</sup> and represented 39.7 % enlargement of the length of the roots during the first 48 hours of germination; 4) the dominant peak in the MALDI mass spectrum, representing the active part of component PRGF<sub>A</sub> is the [M + H]<sup>+</sup> ion *m/z* 867, which probably shows a peptide character.

#### REFERENCES

1. Golais F., Csabayová M., Leško J., Bystrická M., Sabó A.: *Acta Virol.* 36, 505 (1992).
2. Gašperík J., Leško J., Golais F.: *Biol. Zbl.* 115, 71 (1996).
3. Csabayová M., Leško J., Dušinská M., Gašperík J., Golais F.: *Acta Vet. (Brno)* 64, 249 (1995).
4. Urbančíková M., Vozárová G., Leško J., Golais F.: *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 177 (1999).
5. Pieklo R., Gregoraszczyk J., Lesko J., Golais F., Stokłowska S.: *J. Phys. Pharmacol.* 50, 129 (1999).

#### 09 EFFECT OF PSEUDORABIES VIRUS GROWTH FACTOR (PRGF) ON EMBRYONIC AND POSTNATAL DEVELOPMENT OF JAPANESE QUAIL

DALMA LAMOŠOVÁ<sup>a</sup> and JURAJ GAŠPERÍK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji,* <sup>b</sup>*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, 842 51 Bratislava, Slovak Republic*

Mammalian cells infected or transformed by pseudorabies virus produce pseudorabies virus growth factor (PRGF), which have significant biological activities<sup>1,2</sup>. The effect of PRGF on birds has not been investigated yet. Therefore the aim of the present study was to investigate the effect of PRGF on growth and development of Japanese quail. On the base of experiments with PRGF and its separated components on

newborn mice<sup>3</sup> we used more active component of PRGF – component A prepared by the procedure developed by Gašperík<sup>4</sup>. In our experiments Japanese quails from our breeding (IABG SASci, Ivanka pri Dunaji) were used.

The animals were divided to four groups with the same mean body weight and kept under whole daily light and standard temperature conditions in one common box. A starter feeding mash designed for broiler chickens (12.0 IU of metabolizable energy/kg) and water were provided *ad libitum*. Phosphate buffered saline (PBS) (50 µl) at pH 7.2 containing 10<sup>3</sup> U (10 ag), 10<sup>6</sup> U (10 fg) or 10<sup>9</sup> U (10 pg) of PRGF<sub>A</sub> was injected subcutaneously on neck of one- to ten-day-old birds daily. Control group of birds was given 50 µl of PBS. The body mass of birds was determined daily. Ten-day-old animals were decapitated. PRGF<sub>A</sub> administered subcutaneously daily in three concentrations did not cause significant changes of body mass during the first ten days of life of quails.

In experiments *in vitro* the primary culture of muscle cells isolated from 10-day-old quail embryo were used. Fertilised eggs of Japanese quail were incubated in a forced draught incubator with automatic turning every hour at a temperature 37.5±0.2 °C. Cells were isolated by Konigsberg method<sup>5</sup> and seeded (2.25–3.0 million/dish) in DMEM on a 12-well plate and grown at 37 °C in humidified incubator in air supplemented with 5 % CO<sub>2</sub> for 24 h. After 24 h of preincubation, the medium was replaced with fresh medium containing different doses of PRGF<sub>A</sub> (10<sup>3</sup> U, 10<sup>6</sup> U, 10<sup>9</sup> U). The cells in control groups were treated by medium only. The growth of cells was evaluated: 2 h incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine into protein and 18 h incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine into DNA<sup>6</sup>.

The muscle cells isolated from quail embryos and incubated in the presence of different concentrations of PRGF<sub>A</sub> showed increased incorporation of labelled leucine into cell protein. The highest incorporation was found in the presence of the lowest concentration of PRGF (3.6-times higher compared to control). The dose of 10<sup>6</sup> U of PRGF<sub>A</sub> increased the incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine 2.07-times and 10<sup>9</sup> U increased 2.6-times compared to control. The lowest dose of PRGF<sub>A</sub> significantly increased the proliferation of muscle cells and incorporation of labelled thymidine into DNA during 18 h.

In further experiments the influence of PRGF<sub>A</sub> on growth, mortality and hatching of Japanese quail embryos was determined. The eggs with the same mean mass were chosen to experiment (20 pieces in group). The same doses of PRGF<sub>A</sub> (10<sup>3</sup> U, 10<sup>6</sup> U, 10<sup>9</sup> U) as in previous experiments were injected separately into the egg white at day 2 and 5 of incubation. The doses of PRGF<sub>A</sub> were dissolved in 50 µl of PBS and next injected into eggs. To both control groups 50 µl PBS were injected. Eggs were incubated in a forced draught incubator with automatic turning every hour at a temperature 37.5±0.2 °C. Last two days of incubation we determined the hatching quails every three hours and the mortality of not hatching embryos. The hatched quails were divided into groups (in accordance with doses of PRGF<sub>A</sub> and injection day) and kept under the same conditions (standard temperature, 24 h light, water and starter feeding mash designed for young turkey [12.0 IU of metabolizable energy/kg] were provided *ad libitum*). Body weight of animals was determined every day at the same time of day.

PRGF<sub>A</sub> in doses 10<sup>3</sup> U and 10<sup>9</sup> U injected into egg white at the 2nd day of incubation evoked increase of body weight

at hatching compared to control group. All doses of PRGF<sub>A</sub> increased the body mass during the first ten days of life versus control. However, injection of the same doses of PRGF<sub>A</sub> at the 5th day of incubation did not evoke changes of body weight – either hatching weight or in the first ten days of life.

Surprisingly, quails treated by PRGF<sub>A</sub> at the 2nd and at the 5th day of incubation hatched earlier than control group. The groups treated by 10<sup>6</sup> U of PRGF<sub>A</sub> hatched as first in both time of injection. Injection at the 2nd day of incubation enhanced hatching approximately by 6–8 hours and at the 5th day of incubation by 18 hours compared to control.

The mortality of embryos was similar in all groups during embryonic development and after injection at the 2nd day was higher than at the 5th day including control groups.

In conclusion our data indicate that PRGF<sub>A</sub> administered (*in vivo* or *in vitro*) in embryonal period stimulates the proliferation of muscle cells and growth of Japanese quail organism.

## REFERENCES

1. Golais F., Košťál M., Csabayová M., Leško J.: *Acta Virol.* 36, 516 (1992).
2. Golais F., Leško J., Hillerová A., Sabó A., Kolcunová A.: *Biol. Zbl.* 109, 481 (1990).
3. Csabayová M., Leško J., Dušínská M., Gašperík J., Golais F.: *Acta Vet. (Brno)* 64, 249 (1995).
4. Gašperík J., Leško J., Csabayová M., Golais F.: *Acta Virol.* 38, 117 (1994).
5. Konigsberg I. R., in: *Methods in Enzymology* (Jacoby W. B., Pastan I. H., ed.), p. 511. Academic Press, New York 1979.
6. Robinson J. H., Smith J. A., Dee L. A.: *Exp. Cell Res.* 102, 117 (1976).

## 10 ŠTÚDIUM AKTIVITY NIEKTORÝCH VYBRANÝCH AMINOPEPTIDÁZ V IMOBILIZOVANÝCH BUNKÁCH MAKU

JÁN STANO<sup>a</sup>, LADISLAV BILISICS<sup>b</sup>,  
KAROL MIČIETA<sup>c</sup>, DANIELA KÁKONIOVÁ<sup>b</sup>,  
DESANA LIŠKOVA<sup>b</sup> a LÝDIA BEZÁKOVÁ<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Záhrada liečivých rastlín, <sup>d</sup>Katedra molekulárnej a subceluárnej biológie liečiv, <sup>b</sup>Farmaceutická fakulta UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, <sup>c</sup>Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava, <sup>e</sup>Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta UK, Révová 39, 811 02 Bratislava, Slovak Republic

Poznanie a zvládnutie techniky imobilizácie izolovaných buniek a enzýmov je nevyhnutným predpokladom rozvoja biotechnológií, a preto sa v ostatných rokoch štúdiu tohoto problému venuje zvýšená pozornosť. Rastlinné bunky prvýkrát imobilizoval v roku 1979 Brodelius so spolupracovníkmi. Pri tejto imobilizácii použil hydrogel alginátu sodného<sup>1</sup>. Imobilizácia buniek alebo izolovaných enzýmov je veľmi dôležitou cestou uchovávaní (stabilizácie) vysokoúčinných katalyzátorov (enzýmov), dôležitých pre biotransformačné procesy<sup>2</sup>. Pri imobilizácii buniek sa používajú hlavne hydrogély, adhézia a kovalentná väzba buniek na nosiče, resp. imobi-

lizácia buniek glutaraldehydom<sup>3</sup>. Rastlinné proteolytické enzýmy majú dôležitú úlohu pri degradácii oligopeptidov a proteínov, postranslačnej modifikácii proteínov a v ďalších procesoch. Aminopeptidázy (EC 3.4.11) sú prítomné v rôznych rastlinách.

V predloženej práci sme zamerali svoju pozornosť na enzymovú hydrolýzu syntetických substrátov: 4-fenylazofenylamidov (PAP-amid) týchto aminokyselín L-Tyr, L-Ala, L-Phe intaktnými a imobilizovanými suspenznými kultúrami buniek maku siateho (*Papaver somniferum* L.). Bunky maku sa imobilizovali pomocou glutaraldehydu (vnútorné zosieťovanie) a alginátu vápenatého (obalovanie buniek géloom). V bunkách imobilizovaných glutaraldehydom sa zaznamenala vysoká aktivita tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy, invertázy, ako aj galaktozidáz<sup>3</sup>. V bunkách imobilizovaných alginátom je aktivita aminopeptidáz (AP) oveľa vyššia než v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom. Aktivita tyrozín-dekarboxylázy, DOPA-dekarboxylázy, invertázy a galaktozidáz po imobilizácii glutaraldehydom – bifunkčným činidlom (pričným zosieťovaním) je v porovnaní s aktivitou aminopeptidáz pomerne vysoká<sup>4</sup>. Pri imobilizácii L-Tyr AP, L-Ala AP a L-Phe AP je vzhľadom na uvedené skutočnosti výhodnejšie obalovanie buniek pomocou alginátu vápenatého než priečne zosieťovanie glutaraldehydom. AP ako aj niektoré proteázy sa môžu perspektívne využiť pri biotransformácii farmaceuticky a potravinársky dôležitých látok<sup>2,3,5</sup>.

#### LITERATÚRA

1. Brodelius P., Deus B., Mosbach K., Zenk M. H.: FEBS Let. 122, 93 (1979).
2. Janousek D., Sphon U.: Bioforum Int. 1, 38 (1998).
3. Stano J., Nemeč P., Bezákova L., Kákoniová D., Kovács P., Neubert K., Liškova D., Andriamainty F., Mičieta K.: Acta Biochim. Polon. 45, 621 (1998).
4. Stano J., Neubert K., Hegedus L., Andriamainty F.: Cesk. Slov. Farm. 48, 136 (1999)
5. Tomaschová J., Buchinger W., Zemanovič J., Hampel W.: Bull. Potravn. Výsk. 36, 27 (1997).

#### 11 ANTIMYKOBAKTERIÁLNA AKTIVITA BENZOTIAZOLOVÉHO DERIVÁTU A11

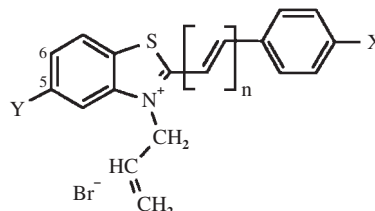
JANA KORDULÁKOVÁ a KATARÍNA MIKUŠOVÁ

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH-1, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Nepostačujúca liečba tuberkulózy v rozvojových krajinách, zvýšený výskyt mykobakteriôz súvisiaci predovšetkým s infekciou HIV a nárast rezistentných mykobakteriálnych kmeňov sú v súčasnosti hlavnými príčinami intenzívneho výskumu nových antituberkulotík.

Antituberkulotický účinok benzotiazolových derivátov bol popísaný už v 70-tych rokoch, kedy sa po prvýkrát ukázala ich schopnosť inhibovať rast pôvodcu tuberkulózy, *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Na Katedre organickej chémie PriF UK Bratislava bolo nasynetizovaných niekoľko derivátov benzotiazolových solí (obr. 1), pričom u niektorých z týchto zlúčenín sa zistila antimykobakteriálna aktivita v *in vitro*

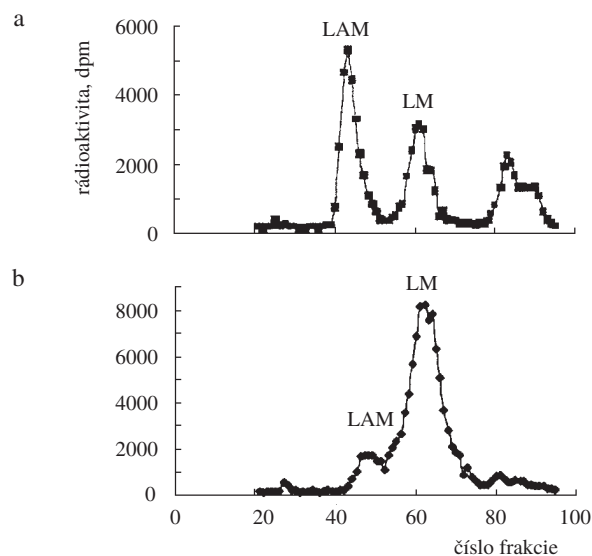
podmienkach v tekutej pôde. Mykobaktérie sú však vnútro-bunkové patogény, schopné prežívať vo vnútri makrofága hostiteľského imunitného systému. Výsledky *in vitro* testov teda nie sú ovplyvnené transportnými mechanizmami buniek, zmenou pH, chemickou modifikáciou, či inými faktormi, ktoré zohrávajú významnú úlohu v *in vivo* podmienkach. Uvedené benzotiazolové soli sa preto testovali pomocou makrofágového modelu, ktorý interakcie antibiotík s mykobaktériami simuluje lepšie. Touto metódou sa potvrdila antimykobakteriálna aktivita látky označovanej ako A11. Zamerali sme sa na štúdium antimykobakteriálnej aktivity tejto látky predovšetkým na molekulárnej úrovni.



Obr. 1. Základná chemická štruktúra testovaných benzotiazolových solí

Ako modelový organizmus sa použil rýchlo rastúci nepatogénny kmeň *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Ukázalo sa, že východiskové látky, kondenzáciou ktorých sa A11 pripravila a ktorých štruktúra je identická s časťou štruktúry A11, ani možný vedľajší produkt syntézy A11, mykobakteriálny rast neinhibovali. Antimykobakteriálna aktivita A11 je teda podmienená celkovou štruktúrou výslednej molekuly.

Účinok látky A11 na molekulárnej úrovni sa študoval pomocou metabolického značenia rastúcich mykobakteriál-



Obr. 2. Gélová filtrácia deacylovaných lipoarabinomananových frakcií na kolóne (118×1 cm) s náplňou Bio-Gel P 100. Na kolónu sa nanieslo 120 000 dpm vzorky po hydrolýze v 0,1 M-NaOH (2 hod, 37 °C). Zbierané frakcie mali objem 1,2 ml; a – LM/LAM frakcia kontrolnej kultúry; b – LM/LAM frakcia kultúry inhibovanej 100 µg.m<sup>-1</sup> A11



nych kultúr, ktoré sa pestovali v prítomnosti rôznych koncentrácií A11 a  $^{14}\text{C}$  glukózy. Tieto bunky sa následne frakcionovali, pričom sa pozornosť sústredila na zložky unikátne pre mykobaktérie, ako sú lipidy, bunková stena, či lipoarabinomanán – povrchový antigén, ktorý zohráva významnú úlohu pri interakciách mykobaktérií s makrofágom hostiteľského imunitného systému.

Najvýznamnejší účinok látky A11 sa odhalil práve vo frakcii obsahujúcej lipoarabinomanán (LAM) a jeho skrátenú formu, lipomanán (LM). Ukázalo sa, že pôsobením A11 dochádza k zníženiu obsahu lipoarabinomanánu. Takýto efekt bol popísaný aj ako jeden z biochemických účinkov v súčasnosti používaného antituberkulotika etambutolu. Zatiaľ čo však v prípade etambutolu sa predpokladá inhibícia *de novo* syntézy arabinánovej zložky LAM, zdá sa, že A11 spôsobuje skôr skracovanie molekuly, čo sa prejavuje splyvaním škvrny LAM a LM na polyakrylamidovom géle.

Znížený obsah a skrátenie lipoarabinomanánu pôsobením A11 sa potvrdili gélovou filtráciou deacylovaných LM, LAM frakcií (obr. 2). Analýza monosacharidového zloženia frakcií LM, LAM pomocou plynovej chromatografie poukázala na výrazné zníženie obsahu arabinánovej zložky lipoarabinomanánu.

Napriek štruktúrálnej podobnosti arabinánového motívu lipoarabinomanánu a arabinogalaktánu nachádzajúceho sa v mykobakteriálnej bunkovej stene, sa súčasná inhibícia oboch molekúl nepozorovala.

Lipoarabinomanán vykazuje široké spektrum imunomodulačných funkcií. Doterajšie štúdie ukázali schopnosť lipoarabinomanánu zúčastňovať sa mnohých klinických prejavov tuberkulózy. Keďže pôsobením A11 dochádza k inhibícii arabinánovej zložky lipoarabinomanánu pri koncentrácii A11, pri ktorej sa ešte inhibícia rastu nepozorovala, jednou z možností praktického uplatnenia takéhoto lipoarabinomanánového inhibítora je využitie A11 na *in vivo* štúdium imunologických vlastností lipoarabinomanánu. V súčasnosti sa látka A11 testuje ako potencionálne antituberkulotikum na zvieracom modeli.

## 12 IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY CHROMATOGRAPHY, REVERSED-PHASE HPLC AND OTHER TECHNIQUES AS TOOLS FOR STUDYING PHOSPHORYLATIONS

RADOVAN HYNEK<sup>a</sup>, JIŘÍ SAJDOK<sup>a</sup>,  
MARKÉTA TESÁŘOVÁ<sup>a</sup>, HANA VAŇKOVÁ<sup>b</sup>,  
and JAN KÁŠ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, <sup>b</sup>Department of Pathological Physiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, U nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic

Phosphorylation of amino acid residues in proteins and peptides is very significant posttranslational modification, which plays important roles in living organisms. As an example, it can serve for regulation of activity in various enzymes. Changes in phosphorylation degree seems to be associated with cancerogenesis in some cases<sup>1,2</sup>.

Model peptides were used for studying different possibilities, which would allow easy identification and isolation of phosphorylated peptides and proteins. For these purposes immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), reversed-phase HPLC (RP-HPLC), ELISA technique and immunoblotting were used. The developed method, combining IMAC and RP-HPLC, was applied to detect phosphorylation degree in different samples of human pepsinogen A. Peptide fragments of human pepsinogens A from various samples of gastric mucosa, prepared by their cleavage with immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin, were separated by this technique. Peptides, containing phosphate group(s), were bound to ferric ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) immobilized on iminodiacetate (IDA)-Sephacrose 6B. The attached phosphorylated peptides were then released with phosphate buffer (pH 5.7). Reversed-phase high-performance chromatography (RP-HPLC) was applied as the subsequent step for the separation of individual phosphopeptides from the mixture obtained by immobilized metal ion affinity chromatography. Chromatographic pattern of pepsinogen A digests from stomach mucosa of patients suffering with gastric cancer were compared with chromatograms obtained from samples of patients without cancer (with peptic ulcer). Significantly, higher amount of phosphopeptides was found in samples obtained from patients with gastric cancer. Higher degree of pepsinogen A phosphorylation seems to be associated with gastric cancer. The developed method represents a reliable tool for studying of phosphorylations of proteins. This technique could serve potentially for early diagnosis of gastric cancer.

*The support of this research provided by the Grant Agency of the Czech Republic, grant no. 203/98/P201, GA ČR is gratefully acknowledged.*

## REFERENCES

1. Huang X. P., Fan X. T., Desjeux J. F., Castagna M.: *Int. J. Cancer* 52, 444 (1992).
2. Boulikas T.: *Int. J. Oncology* 6, 271 (1995).