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

DROBNICOV MEMORIÁL
12. ROČNÍK

Hotel Lomy, Horná Ves

5. – 7. september 2023

Zborník príspevkov a program

Editori

Mária Balážová, Boris Lakatoš

prof. Ing. Ľudovít DROBNICA, DrSc.

DROBNICOV MEMORIÁL

12. ročník

5. – 7. september 2023

Hotel Lomy, Horná Ves

ISBN 978-80-974246-3-3

Redakčná úprava: doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.
Vydal: Centrum biovied - Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2023

Spomienka na prof. Ing. Ľudovíta Drobnicu, DrSc.

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

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

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

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

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

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

ORGANIZAČNÝ VÝBOR:

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

PREDSEDA KOMISIE:

prof. RNDr. Peter RAČAY, PhD.

ČLENOVIA KOMISIE:

Mgr. Miro BALÁŽ, PhD.
Mgr. Mária BALÁŽOVÁ, PhD.
RNDr. Imrich BARÁK, DrSc.
prof. Ing. Albert BREIER, DrSc.
doc. Ing. Boris LAKATOŠ, PhD.
doc. Ing. Petra OLEJNÍKOVÁ, PhD.
doc. Ing. Martin REBROŠ, PhD.
Ing. Zdena SULOVÁ, DrSc.
RNDr. Dušan ŽITŇAN, DrSc.

Obsah

PROGRAM: 9

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV 13

SPONZORI DROBNICOVHO MEMORIÁLU.....62

PROGRAM:

1. Deň: 5. 9. 2023 (utorok)

Registrácia účastníkov počas celého dňa (od 12:00)

12:30 – 14:00 **OBED (Lunch)**

14:00 – 14:45 Otvorenie + plenárna prednáška: **Peter Račay: „Vnútrobunkový stres. Priateľ či nepriateľ?“**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

Predseda: **Albert Breier, Zdenka Sulová**

15:00 – 15:15 **Ivana Barčáková:** Vplyv proteínu p53 na účinok skyrínu v bunkách ľudského kolorektálneho karcinómu

15:15 – 15:30 **Lucia Šofranková:** Heterocyklické zlúčeniny syntetického pôvodu ako nástroj pri liečbe leukemických ochorení

15:30 – 15:45 **Jana Špaldová:** Vplyv kryptopleurínu na bunkové línie akútnej leukémie líšiace sa expresiou P-glykoproteínu

15:45 – 16:00 **Pavol Štefík:** Vplyv fingolimodu na bunky akútnej myeloidnej leukémie

16:00 - 16:15 **Viktória Pecníková:** Úloha redoxnej signalizácie a autofágie v mechanizmoch zahrnutých v účinkoch sulforafanu na toxicitu vyvolanú doxorubicínom v bunkách HEK293

16:15 – 16:30 PRESTÁVKA NA KÁVU (Coffee break)

16:30 – 16:45 **Monika Líšková:** Štúdium pôsobenia TUDCA a PBA na úrovni mitochondrií v SH-SY5Y bunkách

16:45 – 17:00 **Eva Kocianová**: Metabolizmus ako tajná zbraň v boji s rezistenciou testikulárnych nádorových buniek

17:00 – 17:15 **Kristína Šimoničová:** Zmeny v dráhach syntézy pyrimidínových nukleotidov pri rozvoji rezistencie AML bunkových línií voči hypometylačným látkam

17:15 – 17:30 **Barbora Puzderová**: Testovanie terapeutických prístupov na prekonanie rezistencie nádorových buniek voči chemoterapeutiku s využitím 3D modelu

17:30 - 17:45 **Szilvia Kontár:** Izotiokyanáty a ich cytotoxický potenciál na leukemické bunky

POSTEROVÁ SEKCIA (18:00-18:30)

Predseda: **Mária Balážová** + celá komisia

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

2. Deň: 6. 9. 2023 (streda)

7:30 – 9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

Súťaž mladých vedeckých pracovníkov

Sekcia I Xenobiotiká a vzťahy medzi štruktúrou a účinkom látok

Predseda: **Imrich Barák, Miro Baláž**

9:15 – 9:30 **Lucia Dubiel-Hoppanová:** Zmeny hipokampálnej excitability prenatálne aplikovaným antidepresívom v modeli materskej depresie

9:30 – 9:45 **Radič Rebecca**: Mozoček ovplyvňuje naučenú vokálnu komunikáciu dospelých spevavcov

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

Predseda: **Imrich Barák, Miro Baláž**

9:45 – 10:00 **Ivana Ďurišová:** Tvorba pľúcneho surfaktantu v bunkách A549

10:00 – 10:15 **Jaroslava Gužiková**: Vplyv inhibície HRD1 na prežitie a odpoveď bunkových línií nádorov mozgu

10:15 – 10:30 **Ľuboš Hudák:** Odpoveď nezbalených bielkovín v mitochondriách a endoplazmatickom retikule v bunkách SH-SY5Y indukovaná 3-nitropropiónovou kyselinou

10:30 – 10:45 **Božena Omasta:** Lymphocytic choriomeningitis virus requires fatty acids and lipid droplets for propagation

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

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia

Predseda: **Dušan Žitňan, Peter Račay**

11:00 – 11:15 **Silvia Žarnovičanová:** The positioning of sporulation septum in *Bacillus subtilis*

11:15 – 11:30 **Vladimíra Hoďová:** Má neurogenéza u spevavcov cirkadiánny rytmus?

11:30 – 11:45 **Nina Mayerová:** Úloha nových génov v stabilite genómu

11:45 – 12:00 **Ľubica Janovičová:** Význam neutrofilových extracelulárnych pascí a extracelulárnej DNA v animálnom modeli hemolyticko-uremického syndrómu

12:00 – 12:15 **Monika Janíková:** Retrospective study of extracellular DNA in patients with sepsis

12:15 – 12:30 **Klára Gabrišová:** Efekt elektrickej pulznej stimulácie, in vitro modelu cvičenia, na metabolické parametre ľudských myotúb: porovnanie dvoch protokolov

12:30 – 14:00 **OBED (Lunch)**

Sekcia II Molekulárna, celulárna biológia a mikrobiológia (pokračovanie)

Predseda: **Boris Lakatoš, Mária Balážová**

14:00 – 14:15 **Andrej Boroš:** Fyziologické úlohy adipokinetického hormónu

14:15 – 14:30 **Diana Knoblochová:** The role of the receptor guanylyl cyclase in the regulation of water metabolism

14:30 – 14:45 **Daniela Krajčiová:** Charakterizácia dlhoreťazcových acyl-CoA syntetáz z granátovníka a ich potenciál využitia pri heterológnej produkcii kyseliny punikovej v kvasinkách

14:45 – 15:00 **Vanda Klöcklerová:** Characterisation of ITP and ITPL in the silkworm *Bombyx mori*

15:00 – 15:15 **Matej Medla:** Funkcia neuropeptidov pri rozmnožovaní kliešťov *Ixodes ricinus*

15:15 – 15:30 **Monika Janíková:** Retrospective study of extracellular DNA in patients with sepsis

15:30 – 16:00 **Komerčné prezentácie**

Pavol Olejník - Eppendorf

Peter Holták - Ecomed

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

Sekcia III Biotechnológie

Predseda: **Martin Rebroš, Albert Breier**

16:15 – 16:30 **Mário Kočenda:** Využitie odpadového glycerolu z biorafinérií pre produkciu rekombinantnej xylanázy

16:30 – 16:45 **Peter Haluz:** Nové enzýmové prípravy diglykozidov tyrozolu

16:45 – 17:00 **Klaudia Žigová:** Rekombinantné enzýmy využiteľné na vývoj antivirotík

16:45 – 17:00 **Komerčné prezentácie** Soňa Bernátová: Zelené protilátky

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

3. Deň: 7. 9. 2023 (štvrtok)

7:30 – 9:00 **RAŇAJKY (Breakfast)**

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

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

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

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
Prednášky

Plenárna prednáška:

Vnútrobunkový stres. Priateľ či nepriateľ?

Peter Račay [1]

[1] *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniová lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 036 01 Martin*

Na udržanie zdravia sa bunky a tkanivá ľudského tela musia často prispôsobiť rôznym environmentálnym a vnútorným podmienkam, vrátane nedostatku živín a kyslíka, vírusových infekcií a porúch homeostázy bielkovín. Integrovaná stresová odpoveď (ISR) je evolučne zachovaná vnútrobunková signalizačná sieť, ktorá pomáha bunkám a tkanivám vyrovnať sa so stresovými podmienkami a obnoviť bunkovú a tkanivovú homeostázu. ISR je regulovaná štyrmi špecifickými proteín kinázami (PERK, GCN2, PKR a HRI), ktoré katalyzujú fosforyláciu eukaryotického iniciačného faktora eIF2a, čo vedie k zníženiu syntézy bielkovín. Paradoxne, fosforylácia eIF2a tiež spúšťa transláciu špecifických mRNA produkujúcich kľúčové transkripčné faktory, ako je ATF4, ktoré riadia transkripciu génov zapojených buď do obnovy bunkovej homeostázy alebo iniciácie rôznych foriem bunkovej smrti.

Okrem ISR bunky reagujú na nefyziologické podmienky alebo poruchy v cytoplazme, endoplazmatickom retikule (ER) a mitochondriách prostredníctvom špecifických reakcií, ako je proteazomálny, ER a mitochondriálny stres.

Proteazomálny stres ako odpoveď na preťaženie alebo dysfunkciu ubikvitínového proteazomálneho systému (UPS) je charakterizovaný akumuláciou agregátov bielkovín konjugovaných s ubikvitínom a expresiou HSP70, ktorý neutralizuje poškodené bielkoviny prípadne ich translokuje do lyzozómov na ich degradáciu. Proteazomálny stres tiež môže viesť k aktivácii HRI kinázy, ktorá je súčasťou ISR.

Stres ER vyvolaný najmä poruchami syntézy a spracovania bielkovín v ER indukuje odpoveď nezbalených bielkovín (UPR) prostredníctvom aktivácie troch membránových receptorov ER (PERK, ktorý je súčasťou ISR, IRE1 a ATF6). UPR pomáha obnoviť homeostázu redukciou translácie, indukciou expresie ER-špecifických šaperónov a aktiváciou ER-asociovanej degradácie (ERAD). ERAD zahŕňa retro-translokáciu chybne zložených/poškodených bielkovín z ER do cytoplazmy, ich označenie ubikvitínom (prostredníctvom E3 ubikvitín ligázy HRD1 v komplexe so SEL1L) a ich následnú degradáciu prostredníctvom UPS.

Mitochondriálny stres je odpoveďou na rôzne formy dysfunkcie mitochondrií vrátane inhibície OxPhos, depolarizácie mitochondriálneho membránového potenciálu, inhibície importu a spracovania mitochondriálnych bielkovín. Vedie k aktivácii HRI kinázy a UPR špecifickej pre mitochondrie, ktorá závisí hlavne od indukcie expresie šaperónu mtHSP60 a proteázy LONP1 prostredníctvom transkripčného faktora ATF5.

V závislosti od závažnosti alebo trvania stresu môžu byť tiež iniciované rôzne formy bunkovej smrti, čo vedie k dysfunkcii buniek či tkanív a vzniku alebo rozvoju rôznych chorôb ako sú neurodegeneratívne, metabolické alebo malígne choroby.

Pomocou rôznych modelov vnútrobunkového stresu, vrátane globálnej ischémie mozgu, inhibície UPS či narušenia funkcií ER, sme ukázali špecifické reakcie tkanív a buniek na konkrétny stres. Okrem toho sme ukázali, že mierny stres môže aktivovať bunkové reakcie podporujúce prežitie, ktoré zvyšujú odolnosť tkanív a buniek voči následnému letálnemu stresu. Tiež sme ukázali komunikáciu medzi stresom ER a dysfunkciou mitochondrií ako aj medzi stresom ER a proteazomálnym stresom. Neposlednom rade poukazujeme aj na riziká farmakologického prístupu najmä s ohľadom na „off target“ efekty látok použitých v modeloch vnútrobunkového stresu.

Poďakovanie: Práca bola podporená grantami APVV-0245-11, APVV-16-0033, VEGA 1/4255/07, VEGA 1/0277/18, VEGA 1/0183/23

Vplyv proteínu p53 na účinok skyrínu v bunkách ľudského kolorektálneho karcinómu

Ivana Barčáková [1], Zuzana Jendželovská [1], Rastislav Jendželovský [1], Peter Fedoročko[1]

[1] Ústav biologických a ekologických vied, PF UPJŠ, Šrobárova 2, 041 54 Košice

Skyrín je sekundárny metabolit viacerých húb a lišajníkov, patriaci medzi bisantrachinóny. Napriek tomu, že o jeho biologickej aktivite existuje len málo poznatkov, v poslednom období pribúdajú práce popisujúce jeho cytostatický a/alebo cytotoxický vplyv na mnohé ľudské nádorové bunkové línie, avšak mechanizmus stojaci za týmito účinkami dosiaľ nebol objasnený. Výsledky našich predchádzajúcich experimentov však naznačujú, že za jeho cytotoxickým efektom v bunkách kolorektálneho karcinómu HCT 116 a HT-29 by mohla byť indukcia expresie receptora smrti 5 (DR5) [1], ktorý po aktivácii ligandom TRAIL spúšťa apoptózu nádorových, no nie zdravých buniek [2]. Navyše vplyvom skyrínu došlo aj k akumulácii buniek v G1 fáze bunkového cyklu a k zvýšeniu ich citlivosti voči TRAIL, pričom tieto efekty boli výraznejšie v bunkách s normálnym proteínom p53 (HCT 116). Naším cieľom je teda objasniť mechanizmus účinku skyrínu a zhodnotiť jeho potenciálnu využiteľnosť v oblasti zvyšovania citlivosti nádorových buniek voči konvenčnej protinádorovej terapii, prípadne fotodynamickej terapii.

Ako experimentálny model boli použité bunkové línie ľudského kolorektálneho karcinómu HT-29 (exprimuje mutovaný proteín p53 so stratou nádorovej supresorovej funkcie), HCT 116 (exprimuje normálny proteín p53) a od nej odvodená bunková línia HCT 116 p53-/- (neexprimuje proteín p53). Pre determináciu vplyvu skyrínu na mieru expresie vybraných proteínov (DR5, p53, Sp1, kaspáza-3/8/9, PARP, endonukleáza G, LC3B, RIP3) súvisiacich s indukciou expresie receptora DR5 a rôznych typov bunkovej smrti bola využitá analýza Western blot. Vplyv proteínu p53 na účinok skyrínu bol zhodnotený prostredníctvom testu metabolickej aktivity buniek (MTT test). Štatistická signifikancia bola stanovená analýzou variancie (ANOVA) doplnenou o Tukey post-test.

Skyrínom indukovaná expresia receptora DR5 v bunkách kolorektálneho karcinómu nie je sprostredkovaná proteínom p53, napriek tomu, že patrí medzi jeho najvýznamnejšie transkripčné aktivátory [3]. Nepozorovali sme totiž žiadne zmeny v hladine celkovej ani aktívnej formy p53 a štatisticky signifikantný nárast úrovne expresie DR5 sme zaznamenali iba v bunkách HCT 116 p53-/-. Naopak, naše výsledky naznačujú, že za indukciu expresie DR5 skyrínom by mohol byť zodpovedný transkripčný faktor Sp1. MTT test však ukázal, že p53 ovplyvňuje mieru modulácie metabolickej aktivity nádorových buniek skyrínom, pretože bunky HCT 116 s normálnym p53 vykazovali voči skyrínu vyššiu citlivosť ako zvyšné dve bunkové línie. V súvislosti s charakterizáciou bunkovej smrti indukovanej skyrínom sme zistili, že dochádza k spusteniu mitochondriálnej dráhy apoptózy závislej od kaspáz, avšak nie je jasné, či sa na tomto procese podieľa aj DR5, keďže kanonicky DR5 spúšťa najmä receptorovú dráhu apoptózy [2]. Nárast hladiny fosforylovanej formy markera nekroptózy RIP3 a markera autofágie LC3B-II tiež naznačuje možnosť zapojenia týchto dvoch alternatívnych foriem bunkovej smrti.

Naše výsledky poukazujú na to, že účinok skyrínu v bunkách kolorektálneho karcinómu je sprostredkovaný aktivitou proteínu p53, pričom úloha DR5 zostáva nejasná. Pre definovanie konkrétnych úloh týchto proteínov a možnosti využitia skyrínu v protinádorovej terapii budú potrebné ďalšie experimenty.

Literatúra:

[1] BABINČÁK, M. et al., 2021. Death Receptor 5 (TNFRSF10B) Is Upregulated and TRAIL Resistance Is Reversed in Hypoxia and Normoxia in Colorectal Cancer Cell Lines after Treatment with Skyrin, the Active Metabolite of Hypericum spp. Cancers. Vol. 13, no 7, p. 1646. ISSN 2072-6694
[2] KRETZ, A.-L. et al., 2019. TRAILblazing Strategies for Cancer Treatment. Cancers. Vol. 11, no. 4, p. 456. ISSN 2072-6694
[3] TAKIMOTO, R. et al., 2000. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. Oncogene . Vol. 19, no. 14, p. 1735-1743. ISSN 0950-9232

Poďakovanie: Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0003/23.

Heterocyklické zlúčeniny syntetického pôvodu ako nástroj pri liečbe leukemických ochorení

Lucia Šofranková[1], Jana Špaldová[1], Albert Breier[1,2]

[1] *Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*
[2] *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky,Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko*

Rakovina je jednou z najzávažnejších chorôb na svete a je jednou z hlavných príčin celosvetovej úmrtnosti. Je príčinou približne 35% zo všetkých úmrtí a toto percento každým rokom stúpa. Vznik rakoviny – karcinogenéza – sa všeobecne považuje za zložitý a viackrokový proces, pri ktorom dochádza k odlišným molekulárnym a bunkovým zmenám. Na základe rôznych štúdií, ktorých cieľom bolo vyvolať karcinogenézu, sa predpokladá, že vývoj nádoru pozostáva z viacerých samostatných avšak úzko prepojených krokov [1].
Bunková smrť predstavuje konečné štádium života bunky a je dôležitá napríklad pri ontogenéze organizmu. Taktiež hrá významnú úlohu v udržaní homeostázy tkanív. Deregulácia bunkovej smrti má za následok poškodenie orgánov narušenie tejto homeostázy a môže viesť aj k závažným a fatálnym dôsledkom [2].
Schopnosť buniek brániť sa škodlivinám v prostredí ale aj produktom vlastného metabolizmu je základnou vlastnosťou živých systémov. Mechanizmy tejto ochrany však môžu používať aj nádorové bunky a tak sa brániť cytotoxickým účinkom chemoterapie. V tejto súvislosti sa stretávame s viacliekovou rezistenciou. Viaclieková rezistencia (MDR) je prípad získanej rezistencie na viaceré liečivá, s rozdielnou chemickou štruktúrou. Na prekonanie MDR sa v súčasnosti vyvíja čoraz viac látok s rozmanitou štruktúrou [3].
Heterocykly sú jedinečnou a dôležitou skupinou zlúčenín. Predstavujú širokú a variabilnú skupinu organických cyklických zlúčenín so širokým spektrom biologických a fyzikálno-chemických vlastností. Pyrazolové aromatické jadro sa nachádza v širokom množstve prírodných zlúčenín vrátane antibiotík, hormónov, farmaceutických a agrochemických prostriedkoch a mnohých iných látkach. Okrem prírodne sa vyskytujúcich zlúčenín je veľký počet semisyntetických a syntetických heterocyklických zlúčenín u ktorých sa preukázali významné fyziologické a farmakologické vlastnosti. Pyrazolové deriváty predstavujú jednu z najaktívnejších tried zlúčenín vo výskume a majú širokú škálu biologických aktivít [4].

Cieľom tejto práce je preskúmať potenciál novosyntetizovaných N-perfluórfenyl substituovaných pyrazol-5-yl-amínov na myšacej leukemickej línií L1210 a ľudských líniách akútnej myeloidnej leukémie SKM-1 a MOLM-13. V prvej časti sme sa zamerali na cytotoxický účinok derivátov stanovovaný pomocou MTT testu [5]. Následne sme detegovali spôsob bunkovej smrti pomocou cytometra. Predpoklad apoptózy sme potvrdili pomocou fragmentácie DNA a predpoklad autofágie sme overili pomocou konfokálnej mikroskopie za využitia fluorescenčnej sondy monodansylcadaverin Skúmali sme tiež zmeny v mitochondiálnom membránovom potenciály, ktorý je markerom bunkovej smrti, a to pomocou fluorescenčnej sondy JC–1. Keďže sa predpokladá, že pyrazoly ovplyvňujú bunkový cyklus, sledovali sme aj zmeny vyvolané našimi derivátmi na jeho progresiu. Taktiež sme testovali účinok derivátou na aktivitu P-glykoproteinu

Literatúra:

[1] White, Mary C., a kol. The History and Use of Cancer Registry Data by Public Health Cancer Control Programs in the United States. Cancer. 2017. doi: 10.1002/cncr.30905.

[2] RA, Lockshin and Z, Zakeri. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nature reviews. Molecular cell biology. 2001. Vol. 2, (7), 545–550.
[3] K, Wong, a kol. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. Trends in biochemical sciences. 2014. Vol. 39, (1), 8–16.
[4] Aggarwal, a kol.. 5-Aminopyrazole as precursor in design and synthesis of fused pyrazoloazines. Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2018. Vol. 14, 203.
[5] Pavilek, B., a kol.,V., Eur. J. Org. Chem. 2023, 26, e202300410.

Poďakovanie: Práca bola podporená z projektov: APVV-19-0094, APVV-15-0303, VEGA 1/0070/19, projektu Výskumnej agentúry ITMS 2630120006 a internému grantu STU v Bratislave na podporu mladých výskumníkov

Vplyv kryptopleurínu na bunkové línie akútnej leukémie líšiace sa expresiou P-glykoproteínu

Jana Špaldová[1], Lucia Šofranková[1], Albert Breier[1,2]

[1] *Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*
[2] *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika*

Leukémia je typ malígneho ochorenia, ktoré postihuje krv a kostnú dreň a spôsobuje nadprodukciu aberantne diferencovaných leukocytov. K základných typom leukémie patrí jej akútna forma, charakteristická nekontrolovateľným množením blastov. Jednou z hlavných výziev pri liečbe nielen leukémie, ale všetkých typov malignít je zvrátenie viacliekovej rezistencie (MDR). Tá dáva malígnym bunkám schopnosť odolávať chemoterapeutickým látkam s rôznou štruktúrou a mechanizmom účinku. Viaclieková rezistencia sprostredkovaná ABC transportérmi je jednou z najčastejších príčin zlyhania liečby hematologických malignít. Asi najznámejší ABC transpoprtérom je P-glykoproteín (ABCB1), ktorého zvýšená expresia je jedným z hlavných markerov viacliekovej rezistencie a často sa vyskytuje pri akútnej leukémii. Práve preto sme sa v tejto práci zamerali na bunkové línie akútnej lymfoblastickej (L1210) a myeloidnej leukémie (SKM-1, MOLM-13), vrátane ich sublínií exprimujúcich P-glykoproteín.

Z dôvodu zvyšujúceho sa výskytu viacliekovej rezistencie sa neustále hľadajú nové terapeutiká, prípadne deriváty už existujúcich zlúčenín. Veľmi sľubný potenciál v tejto oblasti majú alkaloidy prírodného pôvodu, ktoré sa intenzívne skúmajú z hľadiska ich terapeutických vlastností. V predošlej práci sme sa venovali skúmaniu potencionálneho cytotoxického účinku novosyntetizovaných derivátov chinolizidínu (tienochinolizidínové deriváty a (epi-) benzoanalógy fenantrochinolizidínových alkaloidov). Zistili sme, že jeden z týchto derivátov, a to konkrétne 2,3,4,6,11,11a-hexahydro-1H-benzo[b]quinolizín pôsobil letálne na myšaciu bunkovú líniu L1210. Základná kostra nami testovaných derivátov bola tvorená rastlinným alkaloidom kryptopleurínom, ktorý bol izolovaný už v roku 1948 z kôry austrálskeho vavrínu *Cryptocarya pleurosperma* [1]. Práve preto sme sa rozhodli v tejto práci venovať kryptopleurínu, ktorý predstavuje materskú zlúčeninu skupiny fenantrochinolizidínových alkaloidov, vyznačujúcich rôznorodou biologickou aktivitou [2]. Medzi ich vlastnosti patria napríklad protizápalové, protivírusové a antimikrobiálne účinky. Napriek tomu, že špecifický bunkový cieľ fenantrochinolizidínov nie je známy, už v 70-tych rokoch bolo identifikované množstvo potencionálnych biologických účinkov kryptopleurínu, medzi ktoré patrí primárne inhibícia proteosyntézy a v menšej miere aj inhibícia syntézy RNA a DNA, ktorá môže predstavovať doplnkovú aktivitu zvyšujúcu účinnosť hlavne v bunkách vyznačujúcich sa viacliekovou rezistenciou [3]. Medzi ďalšie potencionálne ciele účinku patrí tiež inhibícia syntézy ribozomálnych podjednotiek, potlačenie signálnych dráh a množstvo regulačných proteínov bunkového cyklu, ako sú cyklín a cyklín-dependentné kinázy [4].

Na stanovenie samotného cytotoxického účinku kryptopleurínu sme použili kolorimetrický test MTT. Ďalším krokom bolo určenie typu bunkovej smrti pomocou prietokovej cytometrie, elektroforetickej analýzy fragmentácie DNA a sledovaním aktivity kaspáz. Pomocou fluorescenčnej sondy JC-1 sme hodnotili zmeny mitochondriálneho membránového potenciálu, ktorý je jedným z markerom bunkovej smrti. Keďže bol popísaný vplyv fenantrochinolizidínov na bunkový cyklus, venovali sme sa tiež sledovaniu bunkovej

proliferácie. Podarilo sa nám zistiť, že kryptopleurín pôsobí cytotoxicky už pri nanomolárnych koncentráciách na všetky testované línie akútnej leukémie, bez ohľadu na prítomnosť P-glykoproteínu a mal vplyv aj na proliferáciu buniek.

Literatúra:

[1] Cui, M., Wang, Q., 2009. Total Synthesis of Phenanthro-Quinolizidine Alkaloids: (±)-Cryptopleurine, (±)-Boehmeriasin A, (±)-Boehmeriasin B and (±)-Hydroxycryptopleurine. Eur. J. Org. Chem. 2009, 5445–5451. https://doi.org/10.1002/ejoc.200900834

[2] Stoye, A., Opatz, T., 2015. Synthesis of (–)-Cryptopleurine by Combining Gold(I) Catalysis with a Free Radical Cyclization. Eur. J. Org. Chem. 2015, 2149–2156. https://doi.org/10.1002/ejoc.201403700

[3] Chemler, S.R., 2009. Phenanthroindolizidines and Phenanthroquinolizidines: Promising Alkaloids for Anti-Cancer Therapy. Curr. Bioact. Compd. 5, 2–19. https://doi.org/10.2174/157340709787580928

[4] Yang, X., Shi, Q., Lai, C.-Y., Chen, C.-Y., Ohkoshi, E., Yang, S.-C., Wang, C.-Y., Bastow, K.F., Wu, T.-S., Pan, S.-L., Teng, C.-M., Yang, P.-C., Lee, K.-H., 2012. Antitumor Agents 295. E-Ring Hydroxylated Antofine and Cryptopleurine Analogues as Antiproliferative Agents: Design, Synthesis, and Mechanistic Studies. J. Med. Chem. 55, 6751–6761. https://doi.org/10.1021/jm3001218

Poďakovanie: Práca bola podporená z projektov: APVV-19-0094, APVV-19-0093, VEGA 2/0030/23, a projektu Grant na podporu mladých výskumníkov STU v Bratislave.

Vplyv fingolimodu na bunky akútnej myeloidnej leukémie

Pavol Štefík[1], Boris Lakatoš[1]

[1] Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko

Sfingolipidy predstavujú jeden z hlavných typov lipidov, ktoré sú prítomné v eukaryotických bunkách. Počas posledných rokov sa preukázalo, že okrem štruktúrnej funkcie plnia sfingolipidy aj úlohu tzv. bioaktívnych lipidov, t. j. slúžia ako signálne molekuly alebo mediátory bunkovej signalizácie [1]. Je známe, že sfingolipidy regulujú množstvo bunkových procesov, akými sú napríklad adhézia, migrácia, proliferácia, starnutie, smrť alebo diferenciácia [1,2]. Nie je preto prekvapujúce, že dysregulácia metabolizmu sfingolipidov alebo sfingolipidmi sprostredkovanej bunkovej signalizácie bola pozorovaná u rôznych typov malígnych buniek a súvisí s nekontrolovateľnou proliferáciou nádorových buniek, tvorbou metastáz, rezistenciou neoplastických buniek voči chemoterapeutikám, potláčaním imunitných odpovedí alebo nádorovými bunkami indukovanou angiogenézou [1–3]. Z tohto dôvodu predstavuje vývoj liečiv, ktoré zasahujú do metabolizmu sfingolipidov alebo sfingolipidmi sprostredkovanej signalizácie, perspektívnu oblasť výskumu zameraného na liečbu onkologických ochorení [4].

Fingolimod (známy aj ako FTY720) je syntetický analóg sfingozínu a používa sa ako imunosupresívum na liečbu relaps remitujúcej sclerosis multiplex [5]. Okrem toho sa fingolimod skúma ako potenciálna antineoplastická látka [6], nakoľko je schopný ovplyvňovať metabolizmus alebo signálne dráhy nádorových buniek. Tento účinok fingolimodu je podmienený jeho pôsobením na rôzne intracelulárne ciele alebo po fosforylácii môže fingolimod aktivovať štyri z piatich receptorov pre sfingozín 1 fosfát, ktoré patria do rodiny receptorov spriahnutých s G proteínmi [3,4].

V našej práci boli ako biologický model použité bunky akútnej myeloidnej leukémie, konkrétne bunky línií SKM-1 a MOLM-13 a ich sublínií, ktoré sa získali selekčným tlakom vinkristínu a vykazujú fenotyp viacliekovej rezistencie vďaka nadexpresii P glykoproteínu, označované ako SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR [7]. LC50 fingolimodu, stanovené pomocou MTT testu a farbenia buniek kalceínom, sú pre bunky línií SKM-1 a SKM-1/VCR porovnateľné (ca. 6 μM), zatiaľ čo bunky MOLM-13/VCR sú na účinok fingolimodu citlivejšie než bunky MOLM-13 (LC50 ca. 6 μM vs. 8 μM). Prostredníctvom dvojitého farbenia buniek fluorescenčne značeným anexínom V a propídiumjodidom, detekcie fragmentácie DNA pomocou elektroforézy v agarózovom géli a stanovenia aktivity kaspáz 3/7, 8 a 9 sa preukázalo, že fingolimod je účinným induktorom apoptózy. Ďalej sa zistilo, že účinok letálnych, ale aj subletálnych koncentrácií fingolimodu sa spája s tvorbou reaktívnych foriem kyslíka, zvýšenou intracelulárnou koncentráciou Ca2+ iónov a poklesom mitochondriálneho membránového potenciálu. Analýza expresie diferenciačných markerov pomocou qPCR preukázala zvýšenú expresiu týchto markerov vplyvom fingolimodu. Tieto výsledky naznačujú potenciál fingolimodu ako látky schopnej meniť diferenciačný stav leukemických buniek, čo môže nájsť využitie pri tzv. diferenciačných terapiách.

Literatúra:

[1] Hannun, Y. A; Obeid, L. M. Nat Rev Mol Cell Biol 2018, 19, 175-191.
[2] Ogretmen, B. Nat Rev Cancer 2018, 18, 33-50.

[3] Wang, P. et al. Cancer Cell Int 2019, 19, 295.
[4] Companioni, O. et al. Front Oncol 2021, 11, 745092.
[5] Brinkmann, V. et al. Nat Rev Drug Discov 2010, 9, 883-897.
[6] Singh, S. K.; Spiegel, S. Adv Biol Regul 2022, 75, 100670.
[7] Imrichova, D. et al. Eur J Pharm Sci 2015, 77, 29-39.

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantmi APVV-19-0093, VEGA 2/0030/23.

Štúdium pôsobenia TUDCA a PBA na úrovni mitochondrií v SH-SY5Y bunkách

Monika Líšková [1], Andrea Evinová [1], Jaroslava Gužiková [1], Zuzana Tatarková [1], Mária Brodňanová [2], Ľuboš Hudák [1], Peter Račay [1]

[1] *Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 036 01 Martin*
[2] *Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4D, 036 01 Martin*

Mitochondrie sú hlavným miestom syntézy energie v eukaryotických bunkách. Okrem toho sa podieľajú aj na ďalších biologických procesoch ako je apoptóza, autofágia, syntéza lipidov či homeostáza vápnika. Tieto vysoko dynamické organely sú obzvlášť dôležité najmä pre neuróny, ktoré majú vysoké energetické požiadavky. Zlepšenie mitochondriálnych funkcií môže prispievať k prevencii či zastaveniu neurodegeneratívnych procesov, čím sa naskytajú ďalšie možnosti na terapiu neurodegeneratívnych ochorení.

Kyselina tauroursodeoxycholová (TUDCA) a kyselina 4-fenylmaslová (PBA) boli schválené Americkým úradom pre kontrolu liečiv (FDA) na liečbu biliárnej cirhózy a porúch cyklu močoviny. Okrem toho ich kombinácia bola schválená na liečbu amyotrofickej laterálnej sklerózy (ALS). Hydrofilná žlčová kyselina, TUDCA, vzniká v malých množstvách aj v ľudskej pečeni, a to konjugáciou sekundárnej žlčovej kyseliny UDCA s taurínom. Mastná kyselina s krátkym reťazcom, PBA, je derivátom kyseliny maslovej, produkovanej bakteriálnou fermentáciou v čreve. Ukazuje sa, že tieto látky, so schopnosťou prieniku cez hematoencefalickú bariéru, pôsobia ako antiapoptotické molekuly s aktivitou podobnou šaperónom, avšak presný mechanizmus ich účinku doposiaľ nie je úplne objasnený.

Táto štúdia sa zaoberá účinkom TUDCA a PBA na ľudské neuroblastómové bunky (SH-SY5Y) so zameraním sa na dôležité funkčné parametre mitochondrií, ako je respirácia mitochondrií, generovanie membránového potenciálu, syntéza ATP a morfologické zmeny mitochondrií. Bunková línia SH-SY5Y je v neurobiológii častým in vitro modelom pre štúdium neurodegenerácie dopaminergných neurónov.

TUDCA vykazuje významné zmeny najmä na úrovni mitochondriálnej respirácie. Použitím vysoko-rozlišovacej respirometrie bola dokázaná redukcia bazálnej respirácie mitochondrií, maximálnej elektrón transportnej kapacity (ET), sukcinátom podporovanej respirácie a respirácie spojenej so syntézou ATP, avšak bez celkového vplyvu na funkčné vlastnosti mitochondrií, ktoré vrátane vnútrobunkovej hladiny ATP a generovania membránového potenciálu, boli zachované. PBA významne zvýšilo ET a respiračnú rezervu, čo koreluje s významne zvýšenou priemernou dĺžkou mitochondrií a ich vetiev. PBA tiež indukuje významne zmeny v tvorbe mitochondriálneho potenciálu, najmä znižuje rozsah depolarizácie mitochondriálneho potenciálu po pridaní ADP, čo by mohlo byť výsledkom zvýšenej respiračnej rezervy. Okrem toho by PBA mohla zvyšovať mieru mitochondriálnych fúzií dokumentovanú zvýšenou priemernou dĺžkou mitochondrií a ich vetiev. Výsledky prezentované v tejto štúdii naznačujú, že PBA by mohla zvýšiť odolnosť buniek voči rôznym stresovým podmienkam, vďaka vplyvu tejto látky na funkcie mitochondrií a ich morfológiu.

Poďakovanie: Práca vznikla za podpory grantu: VEGA 1/0183/23.

Metabolizmus ako tajná zbraň v boji s rezistenciou testikulárnych nádorových buniek

Eva Kocianová [1], Viktória Piatriková [1], Marián Grman [2], Silvia Radenkovič [3], Radivojka Bánová [1], Katarína Káľavská [4,5], Natália Udvorková [5], Alžbeta Hulíková [6], Pawel Swietach [6], Tereza Goliaš [1]

[1] *Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Virologický ústav, Oddelenie nádorovej biológie, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovenská republika*
[2] *Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Ústav klinického a translačného výskumu, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovenská republika*
[3] *Mayo Clinic, 4500 San Pablo Road Jacksonville, FL 32224, Minnesota, USA*
[4] *Jednotka translačného výskumu, LFUK, NOÚ, Klenová 1, 83310 Bratislava, Slovenská republika*
[5] *Slovenská akadémia vied, Biomedicínske centrum, Ústav experimentálnej onkológie, Oddelenie molekulárnej onkológie, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovenská republika*
[6] *University of Oxford, Department of physiology, anatomy and genetics, Sherrington Building, Parks Road, Oxford OX1 3PT, Great Britain*

Nádorové ochorenie semenníkov patrí medzi zriedkavé malignity, avšak u mužov v produktívnom veku predstavuje najčastejšie diagnostikované onkologické ochorenie. Toto ochorenie sa vyznačuje vzrastajúcou incidenciou hlavne u kaukazskej rasy [1]. Rakovina semenníkov sa radí medzi dobre liečiteľné ochorenia. Vďaka terapii na báze cisplatiny vieme vyliečiť až 90% pacientov aj v pokročilých klinických štádiách [2]. U malej skupiny pacientov je pozorovaná primárna rezistencia na chemoterapiu, alebo u nich dochádza k strate senzitivity v dôsledku relapsu ochorenia. Takýto pacienti sa vyznačujú zlou prognózou a nízkou mierou prežívania [3]. Predpokladáme, že rezistencia súvisí aj s remodeláciou metabolizmu nádorových buniek. Skúmanie metabolizmu a mechanizmov rezistencie na cytostatiká sa javí ako veľmi potrebné, pretože získané poznatky môžu prispieť k lepšiemu manažmentu liečby a k zlepšeniu prognózy pacientov s rezistentnými nádormi. Na to, aby sme mohli v boji s rezistenciou zacieliť na metabolizmus, musia byť nádorové bunky semenníkov z metabolického hľadiska ocharakterizované. Preto sme sa rozhodli zamerať sa na metabolické stratégie týchto buniek.

Na základe našich experimentov sme odhalili, že testikulárne nádorové bunky NTERA-2, 2102 Ep a NCCIT citlivé na cisplatinu inklinujú skôr ku glykolytickému metabolizmu, čím sa metabolicky podobajú na zdravé tkanivo semenníkov [5]. Naopak na cisplatinu rezistentné bunky [4] sú viac oxidatívne, pričom u nich dochádza k upregulácii viacerých významných metabolických dráh, medzi ktoré patrí glykolýza, TCA cyklus, či glutaminolýza. Avšak expresia vybraných proteínov asociovaných s bunkovým metabolizmom varíruje medzi bunkovými líniami, pričom najvýraznejšie rozdiely medzi senzitívnymi a rezistentnými bunkami vykazuje bunková línia NTERA-2. Rezistentné bunky NTERA-2 neexprimujú laktát dehydrogenázu A na rozdiel od senzitívnych buniek, ktoré exprimujú všetky tri izoformy laktát dehydrogenázy. Zároveň rezistentné nádorové bunky NTERA-2 majú vyššiu expresiu dýchacích komplexov a

tiež využívajú viac glukózy v Krebsovom cykle ako senzitívne bunky. Metabolomická analýza preukázala, že glutamín je veľmi dôležitým substrátom pre oxidatívny metabolizmus testikulárnych nádorových buniek.

Na základe rozdielov v metabolizme medzi senzitívnymi a rezistentnými bunkami sme sa snažili cieleným ovplyvňovaním metabolizmu vybranými inhibítormi (oxamát, fenformín, diazoxid, valproát, DON) zvýšiť citlivosť rezistentných buniek na cisplatinu.
Hoci sme načrtli možnú súvislosť medzi metabolickými stratégiami týchto buniek a ich citlivosťou na cisplatinu, stále sme na dlhej ceste za poznaním a porozumením chemorezistencie. Veríme, že naše bádanie bude jedným z dielikov puzzle, ktoré dokopy vyskladajú odpoveď ako efektívne liečiť pacientov s rakovinou semenníkov.

Literatúra:
[1] BARONI, T., et al. Frontiers in Endocrinology. 2019, 10, 343.
[2] KELLAND, L. Nature Reviews Cancer. 2007, 7, 573-584.
[3] HANNA, N. H., EINHORN, L. H. The New England Journal of Medicine. 2014, 371(21), 2005-2016.
[4] RATO, L., ALVES, et al. Bioscience Reports. 2012, 32(1), 61-69.
[5] SCHMIDTOVA, S., et al. Cancers. 2019, 11, 1224-1246.

Poďakovanie: Práca vznikla za podpory grantov: VEGA 2/0078/19 a APVV-22-0341.

Zmeny v dráhach syntézy pyrimidínových nukleotidov pri rozvoji rezistencie AML bunkových línií voči hypometylačným látkam

Kristína Šimoničová[1], Ľuboš Janotka [1,2], Helena Kavcová [1], Zdena Sulová [1], Albert Breier [1,3], Lucia Messingerová [1,3]

[1] Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied SAV v.v.i., Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovensko
[2] Ústav biológie, Lekárska fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hnevotinska 3, 77515 Olomouc, Česká republika
[3] Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Významnú úlohu v liečbe pacientov s myelodysplastickým syndrómom (MDS) a akútnou myeloidnou leukémiou (AML) zohrávajú hypometylačné látky (HMA) 5-azacytidín (AZA) a 5-aza-2'-deoxycytidín (DAC). Tieto látky môžu pacientom, ktorí sú v dôsledku vysokého veku a prítomnosti komorbidít nevhodní na intenzívnu terapiu, predĺžiť a skvalitniť život [1,2]. Problémom však je, že mnoho pacientov na túto liečbu neodpovedá (primárna rezistencia), ďalší prestanú odpovedať po niekoľkých cykloch liečby (sekundárna rezistencia) [3]. Pri rozvoji sekundárnej rezistencie na podávané liečivo sa v bunkách navyše častokrát rozvinie aj cross-rezistencia na ďalšie farmakologicky príbuzné látky s podobnou štruktúrou a biochemickými vlastnosťami, či dokonca viaclieková rezistencia voči širokému spektru látok bez zjavného vzťahu v chemickej štruktúre a so zásadne odlišným mechanizmom účinku [4,5]. Napriek intenzívnemu výskumu, mechanizmy rezistencie voči HMA doteraz nie sú celkom objasnené. Cieľom našej práce je prispieť k odhaleniu a pochopeniu mechanizmov sekundárnej rezistencie leukemických buniek voči HMA a identifikovať potenciálne možnosti jej prekonania.

Ako experimentálny model sme v rámci tejto štúdie používali ľudské AML bunkové línie MOLM-13 a SKM-1, z ktorých boli v našom laboratóriu dlhodobou kultiváciou v prítomnosti AZA, resp. DAC vytvorené tri AZA-rezistentné (M/A, M/A*, S/A) a dve DAC-rezistentné (M/D, S/D) bunkové sublínie. Okrem odpovede našich bunkových variantov na AZA a DAC sme stanovovali aj vplyv ďalších dvoch analógov 2'-deoxycytidínu – cytarabínu (AraC) a gemcitabínu (GEM). Obe sublínie pripravené navykaním na DAC ostali senzitívne voči AZA, no vykazovali výraznú cross-rezistenciu voči AraC a GEM. Medzi bunkovými variantmi pripravených navykaním na AZA sme pozorovali výrazné rozdiely. Kým sublínia M/A nevykazovala cross-rezistenciu voči žiadnemu z analógov 2'-deoxycytidínu, v sublínii S/A sme voči nim zaznamenali mierne zníženú senzitivitu a v prípade M/A* dokonca výraznú cross-rezistenciu, a to najmä voči DAC.

Vo všetkých rezistentných variantoch sme v porovnaní s materskými líniami zaznamenali pokles hladiny minimálne jedného z enzýmov zapojených do aktivácie jednotlivých liečiv. Na úrovni mRNA sme však zmeny v expresii nezaznamenali. V kódujúcich sekvenciách týchto génov sme našli niekoľko bodových mutácií, ktoré by mohli byť zodpovedné za ich zníženú proteínovú expresiu či aktivitu. Nakoľko sú tieto enzýmy zapojené v salvage pathway pyrimidínovov, v práci sme sledovali aj vplyv inhibície de novo syntézy pyrimidínových nukleotidov na naše rezistentné sublínie. Konkrétne sme inhibovali enzým dihydroorotát dehydrogenázu pomocou teriflunomidu (TFN). Samotný TFN nepreukázal výraznejší efekt na tieto sublínie v porovnaní s materskými líniami, no v dvoch AZA-rezistentných sublíniách (S/A a M/A*) sme zaznamenali synergický účinok TFN s AZA. V tretej

AZA-rezistentnej sublínii (M/A) však tieto liečivá synergický účinok nepreukázali. Táto sublínia na rozdiel od zvyšných dvoch nevykazuje cross-rezistenciu voči DAC a zároveň je jediná, v ktorej došlo k mutácii uridín-cytidín kinázy 2 (UCK2). Tá by mohla byť kľúčovou v odpovedi na túto kombináciu liečiv.

Nami získané poznatky by v prípade potvrdenia v klinických podmienkach mohli prispieť k lepšiemu nastaveniu liečby MDS a AML pacientov hypometylačnými látkami.

Literatúra:

[1] Steensma, D. P. Blood Cancer J. 8, (2018)
[2] Daver, N. et al. Blood Cancer J. 10, 107 (2020)
[3] Longley, D. et al. J. Pathol. 205, 275–292 (2005)
[4] Moscow, J. A. et al. in Holland-Frei Cancer Medicine 8 (eds. Hong, W. K. et al.) 630–647 (People's Medical Publishing House-USA, 2010)
[5] Breier, A. et al. Anticancer. Agents Med. Chem. 13, 159–170 (2013)

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-19-0093, APVV-19-0094, VEGA 2/0016/22, VEGA 2/0171/21, VEGA 2/0030/23, MVTS COST CA21154 a DoktoGrant APP0260.

Testovanie terapeutických prístupov na prekonanie rezistencie nádorových buniek voči chemoterapeutiku s využitím 3D modelu

Barbora Puzderová [1], Lucia Csáderová [1], Monika Baráthová [1]

[1] *Virologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko*

V reakcii na zmenené podmienky nádorového mikroprostredia, ako je nedostatok kyslíka, a s tým spojená zmena metabolizmu buniek a potreba regulácie pH si nádorové bunky vyvinuli rôzne mechanizmy. Jedným z enzýmov, ktoré sa významne podieľajú na adaptácii nádorových buniek na zmenené nádorové mikropostredie je hypoxiou indukovaná karbonická anhydráza IX (CAIX) [1]. Medzi adaptačné procesy patrí aj vznik rezistencie na chemoterapiu, ktorá je závažným problémom pri liečbe onkologických pacientov. Práve kolorektálny karcinóm (CRC) je jedným z najčastejších nádorových ochorení spojených s rezistenciou na chemoterapiu [2, 3]. Onkologickí pacienti často pociťujú stres, úzkosť a stratu sociálnej opory. Dochádza k aktivácii beta-adrenergnej signalizácie, pričom nadmerná aktivácia beta-adrenergných receptorov a dysregulácia signalizácie podporuje progresiu nádoru, metastatický potenciál, angiogenézu nádoru a tiež rezistenciu voči terapii [4]. Prítomnosť koexistujúcich ochorení, ako sú napríklad kardiovaskulárne ochorenia (KVO) a s tým súvisiace podávanie liečiv, antagonistov beta-adrenergnej signalizácie, predstavuje terapeutickú príležitosť, keďže môže dochádzať k ovplyvňovaniu nádorového mikroprostredia.

Analyzovali sme účinky kombinácie neselektívneho betablokátora propranololu a chemoterapeutika 5-fluoruracilu na citlivé a rezistentné bunky odvodené z kolorektálneho karcinómu v 2D a 3D modeli sféroidov v súvislosti so zmenenými podmienkami mikroprostredia, ktoré predstavuje dlhodobá betablokáda propranololom a rezistencia voči 5-FU. Naše výsledky ukazujú, že dlhodobé aj akútne použitie betablokátora propranololu významne znižuje hladinu HIF-1α aj jeho cieľového proteínu CAIX, v parentálnych aj 5-FU rezistentných kolorektálnych nádorových bunkách. Potvrdili sme významné postavenie CAIX v TME, cieleným blokovaním expresie alebo aktivity tohto proteínu môžeme zásadne ovplyvniť a modulovať TME. Použitie beta blokátora v kombinácii s chemoterapeutikom 5-FU efektívnejšie zasiahlo rast sféroidov, prežívanie nádorových buniek aj ich schopnosť migrácie. Ukázali sme schopnosť propranololu senzitizovať bunky rezistentné voči 5-FU, čo predstavuje dôležitý poznatok potenciálne využiteľný priamo v terapii pacientov s CRC rezistentných na chemoterapiu, kde je liečba neúčinná a blokáda adrenergných receptorov by mohla byť súčasťou alternatívnej liečebnej stratégie. Naše zistenia potvrdzujú, že β-adrenergná signalizácia hrá dôležitú úlohu v nádoroch a ovplyvňuje základné signálne dráhy modulujúce TME a tým aj odpoveď na protirakovinovú terapiu.

Literatúra:

[1] Chiche J., et al. (2010) Adv Enzyme Regul. 50(1):20-33.
[2] Babela R., et al. (2022) Eur J Cancer Prev. ;31(5):415-421.
[3] Longley D. B., Johnston P. (2005) J Pathol. 205(2):275-292
[4] AlbiñanaV., et al. (2022) J Clin Med. 11(15), 4539.

Poďakovanie: Táto práca vznikla s podporou: VEGA 2/0090/20, VEGA 2/0095/23

Zmeny hipokampálnej excitability prenatálne aplikovaným antidepresívom v modeli materskej depresie

Lucia Dubiel-Hoppanová [1], Katarína Ondáčová [1], Stanislava Bukátová [2], Alžbeta Idunková [1], Matúš Tomko [1], Lacinová Ľubica [1]

[1] *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied v.v.i., Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovensko*
[2] *Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied v.v.i., Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovensko*

Depresia sa v súčasnosti stáva bežným ochorením obmedzujúcim psychosociálne fungovanie a významne znižujúcim kvalitu života. Prevalencia depresie u žien je približne dvakrát vyššia ako u mužov. Rizikovým obdobím je najmä tehotenstvo, ktoré je spojené s veľkými hormonálnymi zmenami a poruchami nálady. Depresia postihuje až 20 % žien v perinatálnom období [1-2]. Prenatálna depresia je najvýznamnejším rizikovým faktorom pre postnatálnu depresiu. Nestabilita nálady súvisiaca s depresiou sa zvyšuje v perinatálnom období a ovplyvňuje interakciu matka-dieťa [3]. U novorodencov matiek trpiacich nestabilitou nálady počas tehotenstva dochádza k zvýšeniu rizika kognitívnych, emočných a behaviorálnych porúch [4-6].

V našich experimentoch boli použité dospelé samice potkanov Sprague-Dawley, ktoré boli vystavené náhodne sa striedajúcim stresorom, aby sa vytvoril model depresie. Zvieratá boli vystavené 1-2 stresorom denne. Zoznam stresorov zahŕňal: 1) preplnenie (24 hodín); 2) vystavenie vlhkej podstielke (12 hodín); 3) nedostatok potravy (24 hodín); 4) nedostatok vody (12 h); 5) stres predátora (10 h); 6) pokles klietky pod 45-stupňovým uhlom (6h); 7) stroboskopické svetlo (12 h). Antidepresívum mirtazapín sa podávalo gravidným potkanom od 10. do 20. dňa gravidity v dávke 10 mg/kg/deň. Zvieratám z kontrolnej skupiny bolo podané vehikulum. Gravidné samice potkanov boli rozdelené do štyroch skupín: 1) nestresované (WT), 2) nestresované a liečené mirtazapínom (WT+MIR), 3) stresované (STRESS) a 4) stresované a liečené mirtazapínom (STRESS+MIR). Hipokampálne neuróny boli izolované z P0 mláďat každej skupiny (P0, postnatálny deň 0) a primárne hipokampálne kultúry boli pripravené podľa [7]. Izolované hipokampálne neuróny boli použité na meranie ich elektrofyziologických vlastností (pokojový membránový potenciál (V_{rest}), vstupný odpor (R_{inp}), generovanie akčných potenciálov (AP) a série AP) pomocou metódy patch clamp, monitorovanie tokov vápnika (pomocou fluorescenčného farbiva Fura 2) a imunofluorescenčné farbenie napäťovo riadených vápnikových kanálov.

Použitý model materskej depresie viedol k viacerým zmenám elektrofyziologických vlastností pyramidálnych hipokampálnych neurónov. Vrest neurónov oboch stresovaných skupín bol v porovnaní s ostatnými skupinami významne hyperpolarizovaný. Pozorovali sme signifikantné zmeny vlastností generovaného AP vo všetkých skupinách, najmä v parametroch amplitúda, maximum píku, prah, doba nábehu a šírka. Taktiež sme pozorovali zmeny v hustote napäťovo závislých vápnikových kanálov a v intracelulárnej koncentrácii vápnika v stresovaných skupinách.

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-19-0435 a VEGA 2/0081/22.

Mozoček ovplyvňuje naučenú vokálnu komunikáciu dospelých spevavcov

Rebecca Radič[1], Kristína Lukáčová[1], Ladislav Bačiak[2], Vladimíra Hoďová[1], Ľubica Kubíková[1]

[1] *Centrum biovied SAV, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika*
[2] *Centrálne laboratóriá, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

Poškodenie mozočka léziami, tumormi alebo ischémiou poukazuje na jeho úlohu v kontexte reči. Pri takýchto poškodeniach sa zhoršuje fonácia a artikulácia reči, mení sa hlasitosť a rýchlosť reči, reč sa môže zmeniť na koktavú. To naznačuje zapojenie mozočka aj do modulácie tempa reči. Ďalšie štúdie robené na spevavcoch, ako modeli vhodnom na výskum neuronálnych mechanizmov kontrolujúcich naučenú vokálnu komunikáciu, preukázali prepojenie mozočka so systémom spevu a jeho úlohu pri vokálnom učení mladých spevavcov. Avšak jeho úloha u dospelých jedincov nebola doposiaľ preukázaná. Preto sme si v tejto štúdii dali za cieľ zistiť funkciu hlbokých mozočkových jadier (DCN) prostredníctvom neurotoxických lézií a preskúmať zmeny na úrovni temporálnych alebo sekvenčných vlastností naučenej piesne.

V experimente sme použili 18 dospelých samcov zebričky červenozobej (*Taeniopygia guttata*), ktorým sme pomocou 1% kyseliny iboténovej poškodili DCN a vytvorili bilaterálne excitotoxické lézie. Tri dni po tvorbe lézií sme prostredníctvom zobrazovania magnetickou rezonanciou (MRI) overili správnu lokalizáciu poškodenia. Pomocou imunohistochemického farbenia sme 4 mesiace po lézii detegovali jej efektivitu v oblasti DCN. Spev zebričiek bol kontinuálne zaznamenávaný a vyhodnocovaný pomocou softvéru Sound Analysis Pro 2 dni pred operáciou a každý týždeň po dobu 4 mesiacov po operácii. Spev bol vyhodnocavaný v prvých 10 piesňach zaspievaných doobeda v daný deň. Pri analýze piesní sme kvantifikovali dĺžku spevu (s/bez uvádzacích slabík), celkový počet slabík piesne, počet uvádzacích slabík, počet slabík po uvádzacích slabikách, počet motívov, dĺžku motívu, dĺžku jednotlivých slabík piesne a medzislabikový priestor.

Z MRI scanov sme zistili, že vytvorené lézie sa nachádzali u všetkých experimentálnych jedincov v ich DCN. Pomocou imunohistochemicky farbených rezov sme namerali veľkosť lézie 37,8 ± 4,2 %. Z analýzy spevu sme zistili, že dĺžka spevu sa predĺžila od 14. týždňa po poškodení DCN. Toto predĺženie bolo spôsobené celkovým vyšším počtom slabík, a to uvádzacích slabík aj slabík nasledujúcich po uvádzacích slabikách. Naopak dĺžka motívu sa skrátila od 8. týždňa po lézii, čo bolo spôsobené rýchlejším spievaním jednotlivých slabík piesne, avšak pri medzislabikovom priestore sme nezaznamenali žiadnu zmenu.

Výsledky našej práce naznačujú, že mozoček ovplyvňuje temporálne vlastnosti naučenej piesne dospelých samcov zebričky červenozobej a aj malé poškodenie tejto štruktúry môže viesť k poruchám v produkcii naučenej piesne.

Literatúra:

[1] Spencer, K.A., Slocomb, D.L., 2007. The neural basis of ataxic dysarthria. The Cerebellum 6, 58–65. https://doi.org/10.1080/14734220601145459
[2] Casper, M.A., Raphael, L.J., Harris, K.S., Geibel, J.M., 2007. Speech prosody in cerebellar ataxia. Int. J. Lang. Commun. Disord. 42, 407–426. https://doi.org/10.1080/13682820601056210
[3] Person, A.L., Gale, S.D., Farries, M.A., Perkel, D.J., 2008. Organization of the songbird basal ganglia, including area X. J. Comp. Neurol. 508, 840–866. https://doi.org/10.1002/cne.21699

[4] Nicholson, D.A., Roberts, T.F., Sober, S.J., 2018. Thalamostriatal and cerebellothalamic pathways in a songbird, the Bengalese finch. J. Comp. Neurol. 526, 1550–1570. https://doi.org/10.1002/cne.24428
[5] Pidoux, L., Le Blanc, P., Levenes, C., Leblois, A., 2018. A subcortical circuit linking the cerebellum to the basal ganglia engaged in vocal learning. eLife 7, e32167. https://doi.org/10.7554/eLife.32167

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-20-0344 a VEGA 2/0068/20.

Úloha redoxnej signalizácie a autofágie v mechanizmoch zahrnutých v účinkoch sulforafanu na toxicitu vyvolanú doxorubicínom v bunkách HEK293

Viktória Pecníková[1], Miroslav Barančík[1], Barbora Boťanská[1]

[1] *Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava*

Úvod: Doxorubicín (DOX) je antracyklínové liečivo, ktoré je často používané pri liečbe onkologických ochorení. Limitáciou jeho používania sú toxické účinky na normálne bunky, ako sú bunky srdca, mozgu a obličiek. Dôležitú úlohu v toxicite vyvolanej DOX má zvýšená produkcia reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čo má za následok vznik oxidačného stresu. Na obranu buniek voči oxidačnému stresu slúžia antioxidačné mechanizmy, ktoré sa v bunkách aktivujú pri zvýšenej tvorbe ROS. V týchto mechanizmoch má významnú úlohu signálna dráha sprostredkovaná Nrf-2, ktorá reguluje expresiu a funkciu mnohých endogénnych antioxidantov. Zvýšená produkcia ROS môže tiež indukovať autofágiu, proces v bunke, ktorý hrá úlohu pri udržiavaní normálnej bunkovej homeostázy, a to prostredníctvom degradácie makromolekúl.

Cieľ: Sledovanie účinkov sulforafanu (SFN), potencionálneho aktivátora Nrf-2, na toxicitu vyvolanú DOX v bunkách HEK293. Sledovali sme tiež zapojenie proteínov súvisiacich s autofágiou a redoxnou signalizáciou cez Nrf-2 do mechanizmov zahrnutých v odpovediach buniek na účinky vyvolané pôsobením SFN a/alebo DOX.

Metódy: Ako modelový organizmus sme použili bunky HEK293, ľudské embryonálne obličkové bunky. Cytotoxicitu SFN a DOX, ako aj vplyv SFN na cytotoxicitu vyvolanú DOX, sme sledovali pomocou testu MTT. Zmeny v hladinách špecifických proteínov sme stanovovali pomocou metódy Western blot.

Výsledky: Zistili sme, že SFN významne znižuje cytotoxické účinky DOX v bunkách HEK293. Tieto ochranné účinky SFN boli spojené s významným zvýšením hladín proteínu Nrf-2. Účinkom DOX dochádzalo k znižovaniu aktivity superoxiddismutázy (SOD), aplikácia SFN potláčala tieto negatívne účinky DOX na aktivity SOD.

V súvislosti s autofágiou sme sledovali zmeny v proteínových hladinách niekoľkých markerov autofágie (LC3A/B-II, Atg5, Atg12 a Beclin-1). Podávanie DOX zvyšovalo proteínové hladiny Beclin-1, čo bolo podobné účinku DOX na hladiny Keap-1, pričom predkultivácia buniek so SFN nemala vplyv na zmeny v hladinách Beclin-1 vyvolané DOX. Účinkom DOX dochádzalo v bunkách HEK293 taktiež k zvyšovaniu proteínových hladín ďalších markerov autofágie, a to LC3A/B-II, Atg5 a Atg12. Na rozdiel od Beclin-1, predkultivácia buniek so SFN mala za následok potláčanie zmien v hladinách LC3A/B-II, Atg5 a Atg12 vyvolaných DOX.

Záver: Naše výsledky poukazujú na pozitívne účinky SFN na bunkové poškodenie vyvolané pôsobením DOX v bunkách HEK293. Tieto pozitívne účinky SFN zahŕňajú stimuláciu signalizácie cez Nrf-2 a potlačenie DOX-indukovanej autofágie.

Poďakovanie: Podporené grantmi APVV-18-0548 and VEGA-SR 2/0179/21.

Izotiokyanáty a ich cytotoxický potenciál na leukemické bunky

Szilvia Kontár[1], Anna Bertová[1], Denisa Imrichová[1,2], Alberto Yoldi Vergara[1], Albert Breier[1,2], Zdena Sulová[1]

[1] *Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava*
[2] *Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava*

Vysoký príjem ovocia a zeleniny v strave je jedným z dôležitých faktorov na podporu optimálneho zdravia s cieľom zníženia rizika vzniku mnohých chorôb, vrátane rakoviny. Mnohé štúdie preukázali protirakovinové účinky izotiokyanátov (ITC) ako biologicky aktívnych produktov hydrolýzy glukozinolátov, obsiahnutých v rastlinách z čeľade Brassicaceae (1,2).

V našej práci sme sledovali pôsobenie dvoch ITC, a to aromatického ITC benzylizotiokyanátu (BITC) a alifatického ITC sulforafanu (SFN). Inhibičný účinok oboch ITC sme sledovali na ľudských parentálnych bunkových líniách akútnej myeloidnej leukémie (AML) SKM-1 a MOLM-13, ako aj na od nich odvodených bunkových líniách SKM/VCR a MOLM/VCR s P-gp pozitívnym fenotypom.

Výsledky merania životaschopnosti buniek pomocou CASY TT ukázali vyšší cytotoxický efekt BITC na všetky bunkové línie. Výrazný rozdiel v pôsobení tejto látky v závislosti od fenotypu buniek sme pozorovali v prípade bunkovej línie MOLM-13, ktorá preukázala vyššiu mieru citlivosti voči BITC v porovnaní s jej P-gp pozitívnym variantom MOLM/VCR. Pomocou MTT testu sme dokázali, že SFN v porovnaní s BITC silnejšie potláčal metabolickú aktivitu buniek už pri nižších koncentráciách. Stanovenie spôsobu bunkovej smrti prostredníctvom prietokovej cytometrie po ovplyvnení buniek testovanými ITC odhalil schopnosť týchto látok vyvolať apoptózu. Vyššia miera citlivosti voči použitým ITC sa ukázala v P-gp negatívnych SKM-1 bunkách, pričom BITC vykazoval silnejší účinok. Silnejší inhibičný vplyv aromatického ITC sme pozorovali aj pri analýze expresie génov rodiny BCL-2 zapojených do procesu apoptózy pomocou metódy RT-PCR. Potláčanie expresie proapoptotického génu BAX a antiapoptotických génov BCL-2, BCL-XL a MCL-1 vplyvom BITC sme sledovali v senzitívnych aj v rezistentných bunkách. Pomocou prietokovej cytometrie sme potvrdili schopnosť SFN aj BITC zastaviť bunkový cyklus, avšak v rozdielnych fázach. Vplyvom SFN sme zaznamenali mierny nárast podielu buniek v S fáze, zatiaľ čo BITC spôsoboval výrazné zhromaždenie buniek v subG1 fáze bunkového cyklu. Detekcia expresie génov zúčastňujúcich sa v jednotlivých fázach bunkového cyklu sa uskutočnila na úrovni mRNA (RT-PCR) a proteínov (Western blot). Pokles expresie génu CCND1 na transkripčnej, ako aj na translačnej úrovni sme pozorovali vplyvom SFN a BITC vo všetkých sublíniách. Bazálna expresia tohto génu bola odlišná vzhľadom na fenotyp buniek. BITC vo vyšších koncentráciách (8 a 12 μM) preukázal silnejší inhibičný efekt na expresiu génov kódujúcich cyklín dependentné kinázy a cyklíny podieľajúce sa na regulácii bunkového cyklu.

Získané výsledky jednoznačne poukazujú na to, že z dvoch ITC pôsobí BITC efektívnejšie na použité bunkové modely AML, čo pravdepodobne súvisí so štruktúrnou diverzitou a taktiež aj s rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami týchto ITC.

Literatúra:

[1] Na a kol. Dietary Isothiocyanates: Novel Insights into the Potential for Cancer Prevention and Therapy. Int J Mol Sci. 2023. (24). s. 1962.

[2] Sundaram a kol. Dietary isothiocyanates inhibit cancer progression by modulation of epigenome. Semin Cancer Biol. 2022. (83). s. 353-376.

Poďakovanie: Práca vznikla s podporou projektov APVV-19-0094 a VEGA 2/0130/21.

Tvorba pľúcneho surfaktantu v bunkách A549

Ivana Ďurišová[1], Mária Balážová[1]

[1] *Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Oddelenie biochémie membrán, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika*

Pľúcny surfaktant sa podieľa na výmene plynov znižovaním povrchového napätia počas nádychu a zabraňovaním alveolárnemu kolapsu počas výdychu. Okrem mechanickej funkcie dokáže v pľúcach potlačiť prehnanú prozápalovú odpoveď, ktorá spôsobuje mnohé fyziologické zlyhania [1]. Súčasťou tejto imunitnej odpovede je fosfolipid fosfatidylglycerol (PG). Moduluje funkciu makrofágov a dokáže predchádzať zápalovým procesom, ktoré vedú k zníženiu výmeny plynov v alveolárnom kompartmente. Počas bakteriálnej infekcie kompetitívne súperí s lipopolysacharidom (LPS) o väzbové miesto na receptore TLR4, čím narúša LPS-závislú aktiváciu tohto receptorového komplexu zohrávajúceho ústrednú úlohu v odpovedi buniek na patogény. Naviazaním sa na TLR4 blokuje signálnu kaskádu a inhibuje produkciu cytokínov ako je TNFα (tumor necrosis factor α) alebo IL-8 (interleukín 8), čím potláča zápalovú reakciu [2]. Potlačenie imunitnej reakcie má perspektívu pre pacientov so syndrómom akútnej respiračnej tiesne (ARDS), spôsobený prehnanou imunitnou odpoveďou, ktorá je najbežnejšou príčinou smrti u pacientov s ochorením COVID-19. Vysoké hladiny cytokínov majú za následok cytokínovú búrku, ktorá vedie k zvýšenému riziku multiorgánového zlyhania a nakoniec smrti [3].

Pľúcny surfaktant je produkovaný alveolárnymi bunkami typu II (ATII) [4]. Ako model ATII buniek sa používa ľudská epiteliálna bunková línia A549 odvodená z pľúcneho adenokarcinómu. Bunková línia A549 sa používa už viac ako štyri desaťročia, pričom väčšina experimentov sa vykonáva na krátkodobej (short-term) kultivácii proliferujúcich buniek. Avšak existujú dôkazy, že dlhodobé (long-term) kultúry sa fenotypovo viacej približujú bunkám ATII ako krátkodobé. Pri dlhodobých 25-dňových kultúrach sa bunky A549 naočkujú do kultivačných fliaš a médium sa mení každé 2 až 4 dni. Dlhodobá kultivácia tejto bunkovej línie vedie k jej zníženej proliferácii a k zvýšenej bunkovej „diferenciácii“ na ATII bunky. Okrem toho sa v dlhodobo kultivovaných bunkách našiel vysoký počet multilamelárnych teliesok s podobným obsahom fosfolipidov ako v primárnom pľúcnom tkanive [5]. V porovnaní s krátkodobými kultúrami buniek bola génová expresia proteínov surfaktantu SP-C a SP-D po stimulácii s LPS oveľa vyššia v dlhodobých kultúrach. Tieto fakty podporujú hypotézu, že dlhodobé kultúry buniek A549 by mohli byť vhodnejším modelom pre in vitro štúdie zaoberajúce sa produkciou surfaktantu [6].

Naším cieľom je študovať tvorbu pľúcneho surfaktantu v bunkách A549. Porovnaním krátkodobej a dlhodobej kultivácie buniek stanovíme vhodný čas kultivácie buniek pre vylučovanie surfaktantu. V bunkových líniách budeme vyvolávať zápal pomocou LPS s cieľom porovnať imunitnú odpoveď v krátkodobých a dlhodobých kultivácií. Navyše sa pokúsime tlmiť vyvolaný zápal exogénne podávaným PG, tak ako je opísané v mnohých štúdiách [1,2,7]. Výsledkom bude stanovenie takých podmienok kultivácie buniek A549, ktoré budeme používať pri štúdiu PG a jeho úlohy v tlmení zápalovej reakcie v pľúcach.

Literatúra:

[1] Voelker D. R., Numata M. (2019). J. Biol. Chem. 294(12), p. 4282–4289
[2] Kuronuma K., Mitsuzawa H., Takeda K., et al. (2009). J. Biol. Chem. 284(38), p. 25488–25500
[3] Parasher A. (2021). Postgrad Med J 97(1147), p. 312–320.
[4] Losa, D., Chanson, M. (2015). Cell. Mol. Life Sci. 72(15), p. 2793–2808.
[5] Cooper, J. R., Abdullatif, M. B., Burnett, et al. (2016). PLoS One 11(10), p. e0164438.

[6] Nova, Z., Skovierova, H., Strnadel, J., et al. (2020) Int. J. Mol. Sci. 21(3), p. 1148.
[7] Numata, M., Mitchell, J. R., Tipper, et al. (2020). J. Biol. Chem. 295(6), p. 1704–1715.

Poďakovanie: Táto práca vznikla s podporou VEGA 2/0030/22 a APVV-20-0129.

Vplyv inhibície HRD1 na prežitie a odpoveď bunkových línií nádorov mozgu.

Jaroslava Gužiková[1], Monika Líšková[1], Ľuboš Hudák[1], Mária Brodňanová[2], Peter Račay[1]

[1] Ústav Lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
[2] Martinské centrum pre biomedicínu, Univerzita Komenského v Bratislave

Malígne ochorenia patria medzi vážne problémy humánnej medicíny. Stres endoplazmatického retikula (ER) je spôsobený akumuláciou nesprávne zložených proteínov v ER alebo vzniká ako odpoveď na rôzne podmienky (hypoxia, oxidačný stres, nedostatok rastových signálov, nedostatočné zásoby aminokyselín, nedostatok glukózy a laktátová acidóza). V nádorových bunkách je stres ER spôsobený mikroprostredím nádoru alebo vysokým stupňom translácie.

Eukaryotické bunky reagujú na stres ER prostredníctvom dynamickej signalizačnej siete -odpovede nezbalených bielkovín (UPR – Unfolded Protein Response). UPR je riadená aktiváciou troch hlavných receptorov (senzorov) v membráne ER. Tieto receptory sú – inozitol vyžadujúci enzým 1 (IRE1); ER kináza podobná PKR (PERK) a aktivačný transkripčný faktor 6 (ATF6). UPR riadi obnovenie homeostázy zastavením translácie a zvýšením expresie ER-špecifických šaperónov. Okrem aktivácie UPR sa aktivuje degradácia spojená s ER (ERAD). ERAD sa podieľa na retrotranslokácii chybných proteínov z ER do cytoplazmy, ich označeniu ubikvitínom a následne dochádza k ich degradácii proteazómom.

Retrotranslokáciu chybne poskladaných proteínov a ich značenie ubikvitínom podporuje E3 ubikvitín ligáza HRD1 (HMG-CoA reductase degradation protein 1) v komplexe s SEL1L. Proteínový komplex SEL1L – HRD1 je najkonzervovanejší mechanizmus ERAD u cicavcov. Predpokladá sa, že ERAD predstavuje esenciálny mechanizmus umožňujúci prežívanie aj zdravých buniek, nakoľko značná časť proteínov syntetizovaných na drsnom ER je nesprávne poskladaná a musí byť eliminovaná. V závislosti od úrovne stresu ER môže byť iniciovaná apoptóza či iná forma bunkovej smrti.
Presná farmakologická modulácia stresovej odpovede ER ako aj mechanizmu ERAD môže pomôcť pri vývoji špecifických terapeutických stratégií pri liečbe chorôb a zlepšení dĺžky a kvality života pacientov.

Cieľom projektu bolo preskúmať vplyv inhibície enzýmovej aktivity HRD1 na prežívanie a odpoveď bunkovej línií neuroblastómu SH-SY5Y a glioblastómov T98G a U87. Použili sme špecifický inhibítor HRD1 (LS-102). LS-102 selektívne inhibuje enzymatickú aktivitu HRD1. Tento inhibítor potláča proliferáciu reumatoidných synoviálnych buniek a je potenciálnym terapeutickým cieľom pre reumatoidnú artritídu.

Zistili sme, že inhibícia HRD1 vedie k smrti všetkých skúmaných bunkových línií. Glioblastómové bunky U87 vykazujú najvyššiu citlivosť na LS-102, zatiaľ čo bunky glioblastómu T98G boli najodolnejšie voči LS-102. Pozorovali sme významné zvýšenie expresie HRD1 v bunkách T98G a U87. Ošetrenie buniek T98G pomocou LS-102 vedie k aktivácii dráhy IREIα -XBP1 a následnej aktivácii ribonukleázovej aktivity IRE1α, čo vedie k zostrihu XBP1 na XBP1s. Expresia HRD1 v neuroblastómových bunkách bola tiež zvýšená, ale zmena nebola významná.

Naše výsledky naznačujú, že glioblastómové bunky T98G a U87 odpovedajú na inhibíciu HRD1 prostredníctvom zvýšenej expresie HRD1. Nakoľko ERAD predstavuje esenciálny mechanizmus umožňujúci prežívanie buniek predpokladáme, že zvýšenie expresie HRD1 ako esenciálneho proteínu procesu ERAD predstavuje určitý kompenzačný mechanizmus, ktorým sa bunky snažia vyrovnať s inhibíciou aktivity HRD1.

Literatúra:

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

Poďakovanie: Podporené grantmi UK/60/22 and VEGA 1/0183/23.

Odpoveď nezbalených bielkovín v mitochondriách a endoplazmatickom retikule v bunkách SH-SY5Y indukovaná 3-nitropropiónovou kyselinou

Ľuboš Hudák[1], Jaroslava Gúžiková[1], Monika Líšková[1], Mária Brodňanová[2], Peter Račay[1]

[1] Ústav lekárskej biochémie, Jesseniová lekárska fakulta v Martine, Komenského Univerzita v Bratislave, Malá Hora 4A, 03601 Martin, Slovensko
[2] Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Komenského Univerzita v Bratislave, Malá Hora 4A, 03601 Martin, Slovensko

V posledných rokoch sa mnoho výskumných tímov zaoberajúcich sa malígnymi, neurodegeneratívnymi a kardiovaskulárnymi ochoreniami zameralo na štúdium odpovede nezbalených bielkovín (Unfolded Protein Response, UPR) v mitochondriách a endoplazmatickom retikule (ER) a ich spoločnej komunikácii so zámerom identifikovať účasť týchto mechanizmov na vzniku a rozvoji spomínaných chorôb a potencionálne nájsť molekulárne terapeutické ciele pre liečbu týchto ochorení. Narušenie homeostázy alebo disfunkcia mitochondrii alebo ER vedie k aktivácii organelovo špecifickej UPR, ktorú bunky využívajú na navrátenie homeostázy. Dlhotrvajúci stres, kedy bunka nevie zabezpečiť homeostázu, môže viesť až k bunkovej smrti. Je známe, že mitochondria a ER majú veľmi blízke kontaktné miesta, ktoré využívajú na vzájomnú komunikáciu, výmenu Ca^{2+} iónov, proteínov a lipidov. Preto disfunkcia ER je spájaná s disfunkciou mitochondrii a naopak. V našej štúdii využívame ako bunkový model neuroblastómovú líniu SH-SY5Y, ktorá sa často využíva v neurobiológii ako in vitro model pre štúdium neurotoxicity v dopaminergných neurónoch. Bunky sme ovplyvňovali 3-nitropropiónovou kyselinou (3-NPK), čo je ireverzibilný inhibítor komplexu II dýchacieho reťazca mitochondrií. Relatívne prežívanie buniek sme stanovili pomocou MTT testu. Pozorovali sme, že prežívanie buniek ovplyvnených 1 mM 3-NPK po dobu 48 a 72 hodín bolo signifikantne znížené. Taktiež sme analyzovali expresiu génov pre proteíny, ktoré sú markermi buď ER alebo mitochondriálnej UPR, pomocou Western blot analýzy. Pozorovali sme štatisticky významnú zmenu v expresii proteínov SEL1L, GRP78 a VDAC1 pri bunkách ovplyvnených 1 mM 3-NPK po dobu 24 hodín a pre GRP78 aj pri 0,2 mM koncentrácii. Nadexpresia SEL1L a GRP78 indikuje, že 3-NPK môže indukovať stres ER. Napriek tomu, že sme nepozorovali zmeny v množstve proteínu HRD1, ktorý je zapojený do degradácie asociovanej s endoplazmatickým retikulom (Endoplasmic reticulum-associated degradation ERAD), domnievame sa, že ERAD je funkčný. Kaneko a kol. pozorovali, že nadregulácia SEL1L nepredchádzala zvýšeniu HRD1. Domnievame sa, že ERAD bol indukovaný cez dráhu ATF6, ale našu hypotézu musíme potvrdiť ešte ďalšími experimentmi. Navyše zvýšená expresia VDAC1, proteínu ktorý je súčasťou membrán asociovaných s mitochondriami (MAMs), indikuje že je tu vzájomná komunikácia medzi mitochondriou a ER a že mitochondriálny stres by mohol potencionálne spúšťať stresovú odpoveď v ER na čo poukazujú aj zmeny v expresii GRP78 a SEL1L. Na druhej stane sme nepozorovali významné zvýšenie expresie proteínov typických pre mitochondriálnu UPR ako sú HSP60 a mitochondriálna proteáza LONP1.

Poďakovanie: Podporené grantom VEGA 1/0183/23

Lymphocytic choriomeningitis virus requires fatty acids and lipid droplets for propagation

Božena Omasta[1], Martin Valachovič[2], Jana Tomášková[1]

[1] Institute of Virology, Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak Republic
[2] Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovak Republic

Due to the lack of viral metabolic machinery, all building blocks and energy required for viral replication are provided by the host cell. After entering the cell, viruses alter cellular metabolic pathways to secure successful replication. Every viral family uses different pathways and induces different changes in the cell, therefore needs to be studied individually [1].

Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) is a prototypic virus of the Arenaviridae, which consists of dangerous viruses causing hemorrhagic fever such as Lassa, Machupo, and Junín [2]. Since the interactions of LCMV with cellular metabolism remain unknown, we decided to analyze these interactions with focus on lipid metabolism. Lipids are macromolecules that play an important role in viral replication as they are involved in every step of viral life cycle.

The analysis of fatty acid synthesis during LCMV infection showed an increase in mRNA expression of lipogenic enzymes ATP citrate lyase (ACLY), acetyl-CoA carboxylase (ACC), and fatty acid synthase (FASN). Moreover, pharmacological inhibition of both ACC and FASN caused a 20-fold decrease in the production of infectious LCMV virions, confirming the importance of this metabolic pathway during LCMV replication. Next, we analyzed LCMV kinetics in cells treated with FASN inhibitor C75. Addition of C75 every two hours for 24 h after the infection showed that FASN inhibition inhibits LCMV propagation during the first twelve hours of infection while returning to the control level between 12 and 14 hours post infection (hpi). Since the first LCMV virions begin to form between 8 and 10 hpi, observed results suggest that FASN activity is required during all steps of the LCMV replication cycle.

The analysis of the neutral lipid composition in LCMV-infected cells showed that levels of triacylglycerols (TAG) and steryl esters (SE), the main components of lipid droplets (LDs), are elevated at later stages of LCMV infection. Moreover, staining of lipid droplets using Oil Red O dye showed that numbers of LDs increase during LCMV infection. TAGs consist of three fatty acids attached to a glycerol backbone. TAGs are synthesized by a series of reactions with diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) representing a rate-limiting enzyme. Pharmacological inhibition of DGAT1 by A922500 caused an 11-fold decrease in the production of infectious LCMV virions, showing the importance of TAGs for LCMV propagation. When large amounts of energy are required, TAGs are transported into mitochondria via carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) and oxidized in the process known as β-oxidation. We used etomoxir to pharmacologically inhibit CPT1 and observed an 8.5-fold decrease in LCMV virions, suggesting that LCMV requires higher number of LDs for energy production. However, further studies are needed to fully understand the role of LDs during LCMV propagation.

Antiviral drugs developed against cellular pathways required for viral replication represent a novel approach for treating viral infections as they do not put selective pressure on a virus. As there are currently no available vaccines or effective antiviral drugs for the

treatment of arenavirus infection, acquired data could contribute to the development of antiviral drugs targeting cellular metabolic pathways essential for viral replication.

References:
[1] Thaker, S.K., Ch'ng J., Christofk J.R. BMC biol. 2019, 17, 59.
[2] Moraz M.L., Kunz S. (2011) Expert Rev Anti Infect Ther. 9, p.49

Acknowledgement: This project was supported by VEGA 2/0078/23 grant and 57070342 Doktogrant

The positioning of sporulation septum in *Bacillus subtilis*

Silvia Žarnovičanová[1], Katarína Muchová[1], Evelína Kalocsaiová[1], Jiří Pospíšil[2], Zuzana Chromiková[1], Libor Krásný[2], Imrich Barák[1]

[1] *Department of Microbial Genetics, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia*
[2] *Laboratory of Microbial Genetics and Gene Expression, Institute of Molecular Biology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*

Bacillus subtilis is a unique model organism to study cell division, as it can divide via two modes. In general, bacteria divide by binary fission, where the division septum is formed exactly in the middle of the cell. *B. subtilis* can divide also asymmetrically during sporulation, the simplest process of differentiation. A large amount of knowledge provides a significant advancement in our understanding of how the septum is determined during vegetative growth. However, information about how the asymmetric septum is correctly placed during sporulation is still missing. During this process, *B. subtilis* switches its site of division from the middle of the cell to a position closer to one pole, approximately at 1/6th of the cell length [1]. Several proteins have been implicated to play an important role in correct sporulation septum positioning. Its localization depends on SpoIIE, an essential component of the sporulation septum, and negative regulators of cell division like RefZ and Min system proteins. Here, we studied interactions of SpoIIE with RefZ, EzrA and MinJ using a bacterial two-hybrid system (BACTH), size exclusion chromatography (SEC) and pull-down assays. In addition, we followed the localization and co-localization of these proteins by fluorescence and SIM microscopy during the early stages of sporulation. Importantly, the nucleoid in stage I, composed of two chromosomes, is in the form of an axial filament [2]. We hypothesize that the nucleoid itself serves as a measuring device of the cell that helps to find the asymmetric division site. The axial filament is stretched along the cell axis, with the ori sequences anchored to the cell poles. In cells lacking RefZ protein asymmetric septum is shifted towards mid cell and in cells lacking Min system proteins causes a shift closer toward the pole. We proposed that a multi-protein complex consisting of membrane proteins SpoIIE, MinJ and EzrA and DNA binding protein RefZ together with spatial chromosome organization controls the asymmetric septum positioning.

References:

[1] Barák I., Muchová, K. The positioning of the asymmetric septum during sporulation in Bacillus subtilis. PLoS ONE 13(8), 1–15 (2018).
[2] Bylund J.E., Haines M.A., Piggot P.J., Higgins M.L. Axial filament formation in Bacillus subtilis: induction of nucleoids of increasing length after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. J. Bacteriol. 175(7), 1886–1890 (1993).

Acknowledgement: This work was supported by VEGA – Grant No. 2/0001/21 from the Slovak Academy of Sciences and Grants from the Slovak Research and Development Agency under contracts APVV-18-0104

Má neurogenéza u spevavcov cirkadiánny rytmus?

Vladimíra Hoďová[1], Valentína Marešová[1], Rebecca Radič[1], Ľubica Kubíková[1]

[1] *Centrum biovied SAV, Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Dúbravská cesta 9, 84005 Bratislava, Slovenská republika*

Aktívny proces tvorby nových neurónov, neurogenéza, prebieha u spevavcov podobne ako u cicavcov vo ventrikulárnej zóne (VZ) pozdĺž laterálnej mozgovej komory. Novovzniknuté neuróny odtiaľ migrujú do mnohých oblastí predného mozgu, najmä do jadier sprostredkujúcich spev – HVC v páliu (homológ kôry cicavcov) a AreaX v striate [1]. Neurogenéza je ovplyvnená viacerými procesmi a faktormi. Bunkovým cyklus je fázovo prepojený s cirkadiánnym systémom, ktorý generuje cirkadiánne rytmy molekulárnych, fyziologických aj behaviorálnych procesov počas približne 24 hodín [2, 3]. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť či tvorba, alebo zánik nových neurónov u spevavcov majú cirkadiánny rytmus, a v ktorej fáze dňa dosahujú svoje maximum.

V experimente bolo použitých 36 samcov zebričky červenozobej (*Taeniopygia guttata*), ktoré boli rovnomerne rozdelené do 6 skupín podľa zložitosti spevu. Jedince boli chované pri 12L:12D režime, potravu a vodu mali k dispozícii ad libitum. Každé štyri hodiny im bol intramuskulárne podaný exogénny marker neurogenézy, tymidínový analóg 5-etinyl-2'-deoxyuridín (EdU). Vždy 2 hodiny po podaní boli jedince danej skupiny usmrtené dekapitáciou (ZT2, 6, 10, 14, 18, 22) a mozgy boli rýchlo zmrazené. Mozgy boli narezané na 10 µm hrubé koronálne rezy zachytávajúce štyri úrovne VZ obsahujúce vždy inú oblasť slúžiacu ako anatomickú značku (VZX, VZTSM, VZCA, VZHVC). V týchto častiach VZ boli zafarbené EdU-pozitívne bunky. Zároveň boli počas rezania odobraté aj 60 µm koronálne rezy obsahujúce centrálnu časť VZ a hypotalamus, v ktorých bola metódou real-time PCR analyzovaná génová expresia hodinových génov (Per2, Per3, Cry1, Cry2, Bmal1, Clock), proliferačného markera (PCNA) a apoptických génov (kaspáza 3, Bax, Bcl-2).

Ako prvé sme pomocou kosínorovej analýzy potvrdili, že rytmus cirkadiánnych génov zostal zachovaný. Kosínorovou analýzou sme zistili, že tvorba novovzniknutých EdU+ buniek na žiadnej úrovni VZ a ani pozdĺž celej VZ nevykazuje cirkadiánny rytmus. Avšak, rytmus proliferácie sme špecificky zisťovali aj v „hot-spot" časti VZ, kde je preukázateľne vyššia intenzita tvorby nových neurónov. Zistili sme, že táto centrálna ventrálna časť VZ, na úrovni VZTSM a VZCA, vykazuje cirkadiánny rytmus počtu EdU+ buniek s maximom tvorby v tmavej fáze dňa. Na úrovni mRNA expresie sme nezistili žiadny rytmus proliferačného markera PCNA počas 24 hodín. Analýza expresie troch apoptických génov takisto neukázala cirkadiánny rytmus.

Naše výsledky ukazujú, že neurogenéza v „hot-spot" časti VZ spevavcov vykazuje rytmickú aktivitu v priebehu 24 hodín. Zaujímavé je, že najintenzívnejšia produkcia u zebričky aktívnej počas svetlej fázy dňa sa vyskytuje počas tmavej fázy, podobne ako u nočných hlodavcov. Keďže poruchy cirkadiánneho rytmu sú časté pri neurologických ochoreniach alebo u ľudí pracujúcich v noci, tieto výsledky majú význam pre poznanie mechanizmov regenerácie.

Literatúra:

[1] Brenowitz E. A., Larson T. A. (2015) Neurogenesis in the adult avian song-control system. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(6), a019000.
[2] Ali A. A. H., von Gall C. (2022) Adult Neurogenesis under Control of the Circadian System. Cells 22, 11(5):764.

[3] Bouchard-Cannon P., Mendoza-Viveros L., Yuen A., Kærn M., Cheng H. Y. (2013) The circadian molecular clock regulates adult hippocampal neurogenesis by controlling the timing of cell-cycle entry and exit. Cell Rep. 27; 5(4):961-73.

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantmi APVV-20-0344 a VEGA 2/0068/20.

The role of the receptor guanylyl cyclase in the regulation of water metabolism

Diana Knoblochová[1], Martina Gáliková[1]

[1] *Institute of Zoology SAS, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovak Republic*

The regulation of water balance is essential for the maintenance of health and life. Despite its fundamental importance, little is known about the signaling pathways involved in the regulation of body water. The conservation of signaling pathways throughout the evolutionary spectrum allows us to use simpler model organisms and extrapolate the acquired insights to more complex ones. [1]. *Drosophila melanogaster* is a valuable model organism for studying water metabolism due to its well-characterized genetics and advanced genetic toolbox [2]. Based on knowledge from human physiology, one of the potential players in the regulation of water metabolism in *Drosophila melanogaster* are enzymes known as receptor type guanylyl cyclases. A well-known example of receptor-type guanylyl cyclases in humans is the natriuretic peptide receptor. These receptors are primarily found in the kidneys, where they regulate sodium and water excretion, leading to changes in blood pressure and fluid volume [3]. Seven genes encoding guanylyl cyclases have been identified in *Drosophila melanogaster.* However, one specific gene, Gyc76C, gained the attention of several research groups [4,5,6]. Its importance has been demonstrated during both larval development [5] and adulthood. In adult flies, Gyc76C expression is predominantly observed in immune and stress-responsive epithelial tissues, including midgut and Malpighian tubules [6].

Our study aimed to examine the role of Gyc76C, particularly its involvement in the regulation of water metabolism within adult *Drosophila melanogaster*. Initially, we employed qPCR to investigate whether the expression levels of Gyc76C are affected by nutritional stress conditions, including desiccation, starvation, and osmotic stress. Following this, we utilized the GeneSwitch method to reduce Gyc76C gene expression. Within these individuals, we looked at physiological changes concerning water metabolism, including water intake, the amount of water, and excretion. Additionally, we evaluated the impact of reduced Gyc76C expression on survival when confronted with stress conditions. Our findings indicate that Gyc76C plays an essential role in the regulation of water metabolism and in the response to stress conditions.

References:

[1] Biglou SG, Bendena WG, Chin-Sang I. An overview of the insulin signaling pathway in model organisms Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans. Peptides. 2021;145:170640. doi:10.1016/j.peptides.2021.170640
[2] Mohr SE, Perrimon N. Drosophila melanogaster: a simple system for understanding complexity. Dis Model Mech. 2019;12(10):dmm041871. doi:10.1242/dmm.041871
[3] Della Corte V, Pacinella G, Todaro F, Pecoraro R, Tuttolomondo A. The Natriuretic Peptide System: A Single Entity, Pleiotropic Effects. Int J Mol Sci. 2023;24(11):9642. doi:10.3390/ijms24119642
[4] Schleede J, Blair SS. The Gyc76C Receptor Guanylyl Cyclase and the Foraging cGMP-Dependent Kinase Regulate Extracellular Matrix Organization and BMP Signaling in the Developing Wing of Drosophila melanogaster. PLoS Genet. 2015;11(10):e1005576. doi:10.1371/journal.pgen.1005576

[5] Patel, U., Davies, S. A., & Myat, M. M. (2012). Receptor-type guanylyl cyclase Gyc76C is required for development of the Drosophila embryonic somatic muscle. Biology open, 1(6), 507–515. https://doi.org/10.1242/bio.2012943
[6] Overend G, Cabrero P, Guo AX, et al. The receptor guanylate cyclase Gyc76C and a peptide ligand, NPLP1-VQQ, modulate the innate immune IMD pathway in response to salt stress. Peptides. 2012;34(1):209-218. doi:10.1016/j.peptides.2011.08.019

Acknowledgement: This work was supported by: APVV-19-0196, VEGA [2/0141/20], Seal of excellence and Morepro

Characterisation of ITP and ITPL in the silkworm *Bombyx mori*

Vanda Klöcklerová[1], Ladislav Roller[1], Dušan Žitňan[1]

[1] *Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia*

Insect neuropeptides ion transport peptide (ITP) and ITP-like (ITPL) result from alternative splicing of single itp gene transcript [1]. In insects, these neuropeptides are involved in the regulation of development and water homeostasis [2, 3]. We used in situ hybridisation and immunohistochemistry to determine site- and stage-specific expression of each peptide in the silkworm *Bombyx mori*. Both peptides showed overlapping expression only in six pairs of the brain neurosecretory cells Ia2. ITP appeared after metamorphosis in the male-specific neurons innervating reproductive organs, while ITPL was detected in a pair of dorsolateral interneurons in each of thoracic and abdominal ganglia, and in the thoracic neurosecretory cells which terminate in the vicinity of the prothoracic gland. ITPL was also expressed in the peripheral L1 neurons that project axons into thoracic and abdominal transverse nerves. We identified an upstream regulatory region controlling ITP/ITPL expression in the brain and L1 neurons and used this sequence to prepare stabile transgenic line pITP-Gal4.2. Further crossing with UAS Kir2.1 lineage led to hyperpolarisation of these neurons causing disruption of water homeostasis in silkworms. Our results suggest that ITP and ITPL together take part in regulation of water homeostasis, but their differential expression suggest these neuropeptides exhibit different sex- and stage-specific functions that may include regulation of reproduction and steroid production.

References:

[1] Dai L, Žitňan D, Adams MA (2007) J Comp Neurol 500:353–367.
[2] Begum K, Li B, Beeman RW, Park Y (2009) Insect Biochem Mol Biol 39:717–725.
[3] Gáliková M, Dircksen H, Nässel DR (2018) PLoS Genet 14(8):e1007618.

Acknowledgement:

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency (APVV-16–0395, APVV-18–0201, APVV-21–0431).

Význam neutrofilových extracelulárnych pascí a extracelulárnej DNA v animálnom modeli hemolyticko-uremického syndrómu

Ľubica Janovičová[1], Alexandra Lesayová[1], Jakub Janko[1], Michal Pastorek[1], Peter Celec[1,2]

[1] *Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko*
[2] *Ústav Patologickej Fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko*

Hemolyticko-uremický syndróm (HUS) je spôsobený Shiga toxínom, ktorý produkujú niektoré kmene baktérie *Escherchia coli*. Charakteristické znaky HUS zahŕňajú hemolytickú anémiu, zlyhanie obličiek a trombocytopéniu [1]. Shiga toxín poškodzuje rôzne tkanivá, ako je črevná sliznica, vaskulárny endotel a renálny epitel. To vedie k uvoľneniu molekulárnych vzorov spojených s poškodením medzi ktoré patrí aj extracelulárnej DNA (ecDNA), ktorá ďalej stimuluje zápal. Mitochondriálna ecDNA je známy stimulant tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí [2]. Deoxyribonukleázy na druhej strane môžu tomuto procesu zabrániť tým, že štiepia uvoľnenú ecDNA [3]. Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať tvorbu neutrofilových extracelulárnych pascí, uvoľňovanie ecDNA a úlohu deoxyribonukleáz pri štiepení ecDNA v animálnom modeli HUS. Hypotézou bolo, že HUS zvýši počet cirkulujúcich neutrofilových extracelulárnych pascí, ako aj ecDNA, a tento účinok bude kompenzovaný zvýšenou aktivitou deoxyribonukleázy v plazme. Dospelým myšiam kmeňa C57Bl/6 bol injekčne podaný Shiga toxín 2 (30 ug/kg) na vyvolanie HUS a o 48 hodín neskôr bola týmto myšiam odobratá krv. Neutrofily a neutrofilové extracelulárne pasce boli analyzované v krvi pomocou prietokovej cytometrie. Na izoláciu ecDNA sa použila EDTA plazma. Koncentrácia ecDNA bola meraná pomocou fluorometrickej metódy (Qubit) a real-time PCR s primermi pre jadrovú a mitochondriálnu DNA. Deoxyribonukleázová aktivita bola meraná pomocou gélovej metódy SRED. Močovina v krvi bola 3-krát vyššia ($p<0,001$) u myší, injektovaných Shiga toxínom. Koncentrácia celkovej ecDNA v plazme myší s HUS bola vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou (o 133 %, $p<0,001$). Real-time PCR poukázala na to, že tento rozdiel bol spôsobený hlavne ecDNA jadrového, ale nie mitochondriálneho pôvodu. Deoxyribonukleázová aktivita v plazme bola vyššia o 55 % ($p=0,02$) u myší s HUS. Napriek vyššej deoxyribonukleázovej aktivite u myší s HUS žiadna korelácia s celkovou ecDNA nebola pozorovaná. Počet neutrofilov v krvi u myší s HUS bol vysoko variabilný (CV = 72 %) a významne sa nelíšil od kontrol. Podobne tvorba neutrofilových extracelulárnych pascí vykazovala vysokú interindividuálnu variabilitu, ale žiadny rozdiel medzi skupinami nebol pozorovaný. Koncentrácia ecDNA v plazme myší HUS naznačuje, že ecDNA pravdepodobne pochádza väčšinou z poškodenia tkaniva spôsobeného toxínom Shiga, a nie z neutrofilov a zápalovej odpovede. Vyššia deoxyribonukleázová aktivita pravdepodobne moduluje štiepenie uvoľnenej ecDNA a mala by byť ďalej študovaná ako potenciálny terapeutický cieľ HUS.

Literatúra:

[1] Joseph, A., et al., Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. Toxins (Basel), 2020. 12(2).
[2] Fuchs, T.A., et al., Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(36): p. 15880-5.
[3] Gaal Kovalcikova, A., et al., Extracellular DNA concentrations in various aetiologies of acute kidney injury. Sci Rep, 2022. 12(1): p. 16812.

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantom APVV (APVV-22-0554).

Charakterizácia dlhoreťazcových acyl-CoA syntetáz z granátovníka a ich potenciál využitia pri heterológnej produkcii kyseliny punikovej v kvasinkách

Daniela Krajčiová[1], Martina Garaiová[1], Roman Holič[1]

[1] *Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Centrum biovied SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovensko*

Kyselina puniková (PuA; C18:3) patrí medzi vzácne izoméry konjugovanej kyseliny linolénovej s možnosťou využitia vo farmácii a medicíne [1]. Hlavným zdrojom tejto nezvyčajnej mastnej kyseliny je olej zo semien granátovníka (*Punica granatum*). V posledných rokoch je vyvíjaná snaha pre vytvorenie jej alternatívneho zdroja, avšak žiadny z transgénnych organizmov ju zatiaľ nedokáže efektívne akumulovať [2 – 4]. Jedným z faktorov by mohla byť znížená aktivita natívnej acyl-CoA syntetázy (ACS) hostiteľského organizmu voči PuA. Dlhoreťazcové acyl-CoA syntetázy (LACS) predstavujú skupinu ACS so schopnosťou aktivovať mastné kyseliny s dlhým reťazcom. V rastlinných bunkách existuje niekoľko izoforiem LACS s rôznou funkciou a špecificitou substrátu. LACS špecifická pre PuA ešte nebola popísaná. Predpokladáme, že identifikácia takejto LACS by mohla významne pomôcť pri konštrukcii rekombinantných organizmov schopných efektívnej produkcie PuA.
V práci sme sa zamerali na štúdium troch zatiaľ necharakterizovaných LACS z *P. granatum*. Schopnosť predikovaných LACS aktivovať mastné kyseliny sme potvrdili v mutantnom kmeni kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s deléciou v hlavných ACS. Získané výsledky v delečnom kmeni zároveň naznačili ich odlišnú substrátovú špecificitu. Vplyv jednotlivých LACS na akumuláciu PuA sme študovali v rekombinantnom kmeni kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*, pričom prítomnosť každej z nich viedla k celkového navýšeniu PuA v bunke. V prípade jednej izoformy sme navyše pozorovali výrazné zníženie množstva PuA vo frakcii voľných mastných kyselín, čo môže naznačovať jej vyššiu substrátovú preferenciu pre PuA.

Literatúra:
[1] Holic R., Xu Y., Caldo K. M. P., et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(8), p. 3537
[2] Garaiova M., Mietkiewska E., Weselake R. J., et al. (2017) Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(21), p. 7913
[3] Xu Y., Mietkiewska E., Shah S., et al. (2020) Metab. Eng. 62, p. 20
[4] Urbanikova V., Park Y.-K., Krajciova D., et al. (2023) Int. J. Mol. Sci. 24(10), p. 8823

Poďakovanie: Práca vznikla vďaka finančnej podpore grantov APVV-20-0166, VEGA 2/0012/20 a APP0420.

Úloha nových génov v stabilite genómu

Nina Mayerová[1], Kristína Hrašnová[1], Tatiana Motošická[1], Mária Šmondrková[1], Ivana Míšová[2], Silvia Bágeľová Poláková[2]

[1] *PriF UK, Ilkovičova 3278/6, 841 04 Bratislava, Slovensko*
[2] *SAV, Štefánikova 49, 814 38 Bratislava, Slovensko*

Genómová stabilita je nevyhnutná pre správny priebeh všetkých bunkových procesov. Jedným z mechanizmov udržiavania tejto stability je oprava poškodení DNA či reštart zastavených replikačných vidlíc prostredníctvom homologickej rekombinácie. Rekombináza Rad51 je kľúčová v priebehu oboch mechanizmov. V našej práci sme sa venovali prepojeniu prestavby chromatínu a Rad51 závislým procesom. Prostredníctvom genetických interakcií sme identifikovali gény kódujúce proteíny prestavby chromatínu zapojené do opravy DNA. Pre podrobnejšiu charakterizáciu sme vybrali podjednotky histón deacetylázového komplexu Clr6 I‘, histón šaperón Nap2 a ATP-závislé proteíny prestavby chromatínu Hrp1 a Hrp3. Predbežné dáta poukazujú na ich možnú funkciu ako v homologickej rekombinácii, tak v reštarte zastavených vidlíc.

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantami VEGA 23/094/00 a APVV 21-0210.

Fyziologické úlohy adipokinetického hormónu

Andrej Boroš[1], Diana Knoblochová[1], Martina Gáliková[1]

[1] Ústav zoológie SAV, v. v. i. Dúbravská cesta 9, 845 06 Karlova Ves - Bratislava, Slovensko

Vínna muška drozofila (*Drosophila melanogaster*) je populárnym modelom pre skúmanie genetických regulácií mnohých procesov, vrátane tých, s ktorými sa stretávame i u človeka. Drozofily sa napríklad používajú na štúdium metabolizmu a jeho porúch, akými sú napríklad obezita či cukrovka. V tejto súvislosti je často skúmaný aj neuropeptid adipokinetický hormón (AKH), krátky peptid produkovaný orgánom corpora cardiaca. Tento anti-obezitný hormón stimuluje mobilizáciu energetických zásob, a preto je často prirovnávaný ku cicavčiemu glukagónu. AKH bol skúmaný v mnohých súvislostiach, od potenciálnych úloh vo vývine až po možné roly v rozmnožovaní či dĺžke života. Jeho potenciálne úlohy v regulácii vodného metabolizmu však zatiaľ preskúmané neboli. V mojej práci sa preto venujem práve tomuto aspektu. Nepublikované výsledky z nášho laboratória naznačujú, že AKH reguluje množstvo telesných tekutín. Táto funkcia sa zdá byť závislá na AKH receptore exprimovanom v nervovej sústave, nie v tukovom telese. V mojej práci sa preto budem venovať úlohe AKH v príjme a výdaji vody, a následne plánujem charakterizovať konkrétne neuróny zodpovedné za dané funkcie. Tento prístup môže rozšíriť pohľad na komplexné interakcie medzi endokrinným a nervovým systémom a prispieť k objasneniu pomerne nepreskúmanej oblasti interakcií medzi vodným a energetickým metabolizmom.

Literatúra:

[1] Gáliková M, Diesner M, Klepsatel P, et al. Energy Homeostasis Control in Drosophila Adipokinetic Hormone Mutants. Genetics. 2015;201(2):665-683. doi:10.1534/genetics.115.178897

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantami APVV-19-0196, VEGA [2/0141/20] a Slovenskou akadémiou vied [Seal of excellence, Morepro]..

Funkcia neuropeptidov pri rozmnožovaní kliešťov Ixodes ricinus

Matej Medla[1], Ivana Daubnerová[1], Juraj Koči[1], Ladislav Roller[1], Mirko Slovák[1], Dušan Žitňan[1]

[1] Ústav zoológie, SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 84506, Bratislava, Slovensko

Kliešte *Ixodes ricinus* patria k najznámejším parazitom na severnej hemisfére. Prenášajú široké spektrum patogénov, z ktorých niektoré spôsobujú závažné ochorenia aj u ľudí. Avšak, detailný proces, akým dochádza k prenosu patogénov z kliešťa na hostiteľa, a aké faktory ho ovplyvňujú ani dnes nie je celkom známy. Biologické funkcie nielen u hmyzu, ale aj u kliešťov sú do veľkej miery pod kontrolou neuropeptidov. Tie predstavujú rozmanitú skupinu signálnych molekúl a po naviazaní sa na svoje receptory regulujú napríklad príjem potravy, rozmnožovanie, vývin, ale aj cirkadiánne rytmy.

V našej štúdii sme sa zamerali na dva neuropeptidy: myostimulačný (MSP) a myoinhibičný peptid (MIP), oba prítomné v samčích aj samičích reprodukčných orgánoch a čreve kliešťov *I. ricinus*. Pomocou imunohistochemického farbenia sme neuropeptidy detegovali v centrálnej nervovej sústave (synganglione) a v axonálnych výbežkoch neurónov inervujúcich periférne orgány. MIP-imunoreaktivitu sme pozorovali aj v enteroendokrinných bunkách na predných lalokoch čreva samíc. Oba neuropeptidy majú v genóme I. ricinus po dva GPCR receptory, ktoré sú vysoko špecifické iba k svojmu ligandu. Na zistenie funkcie neuropeptidov u kliešťov sme použili in vitro metódu aplikácie syntetických neuropeptidov vo vybraných koncentráciách priamo na orgány kliešťov. Kliešte boli imobilizované na Petriho miske pomocou dentálneho vosku v kvapke fyziologického roztoku. Efekt neuropeptidov sme zaznamenávali na videu.

Na základe predbežných výsledkov, predovšetkým z farbenia a *in vitro* experimentov predpokladáme, že neuropeptidy MSP a MIP by mali zohrávať esenciálnu funkciu pri oplodnení samíc; zároveň signalizácia MSP by mala u samíc *I. ricinus* predstavovať signál na vstup do rýchlej fázy cicania krvi.

Kľúčové slová: *Ixodes ricinus*, neuropeptidy, imunohistochémia, rozmnožovanie

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantmi APVV-18-0201, APVV-21-0431, VEGA-2/0070/23 a VEGA-2/0037/23.

Retrospective study of extracellular DNA in patients with sepsis

Monika Janíková[1], Nikola Pribulová[1], Barbora Vlková[1], Kristína Macáková[1], Mária Bucová[3], Celec Peter[1,2]

[1] *Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovakia*
[2] *Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovakia*
[3] *Institute of Immunology, Faculty of Medicine, Comenius University, Odborárske námestie 14 811 08, Bratislava, Slovakia*

Sepsis is a life-threatening immune dysfunction caused by the dysregulated host response to infection [1]. Sepsis is acknowledged by World Health Organization as a global health priority due to intolerably high mortality and long-term morbidity for those who survived [2]. Sepsis biomarkers play an important role in diagnosing sepsis, enabling early intervention, and offering prognostic insights [3]. Recently, extracellular DNA (ecDNA) has emerged as a potential biomarker for predicting outcomes in patients with sepsis. In this retrospective study, we evaluated importance of ecDNA in patients with sepsis and its possible correlation with sequential organ failure assessment (SOFA) score.

We tested 27 adult patients (17 males and 10 females) admitted to the intensive care unit (ICU) of the 1st Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University and University Hospital, Bratislava, Slovakia. Out of these 27 patients, 8 was diagnosed with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), 7 was diagnosed with sepsis and 12 with septic shock. The ecDNA was isolated from plasma and quantified by fluorometric method (Qubit) and real-time PCR using primers for nuclear (beta-globin) and mitochondrial (D-loop) DNA. Deoxyribonuclease activity was measured from plasma samples using single radial enzyme diffusion assay in agarose gel.

No significant differences were found between ecDNA concentrations in patients with SIRS, sepsis and septic shock diagnosis. The ecDNA concentrations were higher by 485% in non-survivors than in survivors ($p=0.04$) in predicting death by day 7. No significant differences were found between nuclear and mitochondrial DNA, and deoxyribonuclease activity in patients with SIRS, sepsis and septic shock diagnosis. We demonstrated moderately positive correlation between DNA concentrations and SOFA score ($r=0.55$; $p=0.01$).

Our findings indicate that ecDNA could serve as a valuable biomarker for predicting sepsis outcomes. However, data in this study are very limited by small number of patients. To establish the role of ecDNA as a prognostic biomarker more definitively, further investigation within a larger patient cohort is needed.

References:

[1] Singer M, Deutschman CS, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287. PMID: 26903338; PMCID: PMC4968574.
[2] Cecconi M, Evans L, et al. Sepsis and septic shock. Lancet. 2018 Jul 7;392(10141):75-87. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29937192.
[3] Pierrakos C, Velissaris D, et al. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. Crit Care. 2020 Jun 5;24(1):287. doi: 10.1186/s13054-020-02993-5. PMID: 32503670; PMCID: PMC7273821.

Acknowledgement: This study was supported by the Slovak Research and Development Agency APVV-22-0554.

Efekt elektrickej pulznej stimulácie, *in vitro* modelu cvičenia, na metabolické parametre ľudských myotúb: porovnanie dvoch protokolov

Klára Gabrišová[1], Tímea Kurdiová[1], Natália Pálešová[1], Jozef Ukropec[1], Barbara Ukropcová[1,2]

[1] *Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovensko*
[2] *Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko*

Úvod: Pravidelná fyzická aktivita vedie k zlepšeniu a k udržaniu celkového zdravia človeka. Avšak, molekulárne mechanizmy vedúce k cvičením-indukovaným adaptačným procesom stále nie sú úplne objasnené. Elektrická pulzná stimulácia (EPS) dokáže vyvolať viditeľné kontrakcie diferencovaných svalových buniek, myotúb, vďaka čomu mimikuje cvičenie v *in vitro* podmienkach.
Cieľ: Našim cieľom bolo porovnať a identifikovať EPS protokol, ktorý bude efektívnejší v indukcii fyziologickej odpovede ľudských myotúb.
Materiály a metódy: Diferencované primárne ľudské svalové bunky pochádzajúce od zdravých štíhlych mužov (n=3-4, 31,0±2,4 rokov, BMI=23,7±0,8 kg/m2) boli vystavené dvom protokolom EPS (Ionoptix, USA): i) KS - 24h kontinuálna (frekvencia 1 Hz, trvanie pulzu 2 ms); a ii) IS - intermitentná stimulácia, počas ktorej sa striedala podprahová (0,2 Hz; trvanie pulzu 4 ms) a vysokofrekvenčná stimulácia (frekvencia 5 Hz, trvanie pulzu 4 ms), cyklus bol opakovaný 9x po dobu 24h. Po ukončení EPS sme v myotubách stanovili oxidáciu rádioaktívne značenej ^{14}C-glukózy a ^{14}C-palmitátu, inkorporáciu ^{14}C-glukózy do glykogénu, a expresiu vybraných markerov svalových vláken (qPCR).
Výsledky: Oba typy protokolov EPS viedli k viditeľným kontrakciám myotúb, pričom sa zvýšila inkorporácia glukózy do glykogénu, a to o 50% vplyvom kontinuálnej (p=0,006, n=3) a o 34% vplyvom intermitentnej stimulácie (p=0,005, n=3). Avšak, oxidácia glukózy sa zvyšovala iba po intermitentnej stimulácii (+28%, p=0,084, n=3). Intermitentná stimulácia tiež viedla k signifikantnému zvýšeniu celkového využitia glukózy bunkou (+28%, p=0,003, n=3), zatiaľ čo po kontinuálnej bol pozorovaný iba trend, so zvýšením o 18% (p=0,074, n=3). Po intermitentnej stimulácii sme pozorovali aj zvýšenie pri celkovom využití palmitátu bunkou, a to o 20% (p=0,067, n=4). Kontinuálna stimulácia zvýšila expresiu mRNA pre *MYH2* (marker rýchlych IIa vláken) o 60% (p=0,0356, n=4), *MYH7* (marker pomalých I vláken) o 27% (p=0,0543, n=4), avšak nezaznamenali sme žiadne zmeny v expresii mRNA pre *MYH1* (marker rýchlych IIx vláken) (p=0,1578, n=4).
Záver: Elektrická pulzná stimulácia je účinným nástrojom pre štúdium cvičením-navodených adaptačných mechanizmov v *in vitro* podmienkach. Zistili sme, že intermitentná EPS je efektívnejšia v indukovaní fyziologických odpovedí na úrovni metabolizmu, a to zlepšením oxidácie glukózy a palmitátu.

Poďakovanie: Práca bola podporená z projektov APVV 20-0466, MZCR NU21-05-00322, VEGA 2/0144/23.

Nové enzýmové prípravy diglykozidov tyrozolu

Peter Haluz[1], Elena Karnišová Potocká[1], Peter Kis[1], Matej Cvečko[1], Mária Mastihubová[1], Vladimír Mastihuba[1]

[1] *Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 5807/9, 845 38 Bratislava, Slovensko*

Diglykozidázy predstavujú skupinu endoglykozidáz, ktoré okrem hydrolýzy diglykozidov nachádzajú využitie aj v syntéze oligosacharidov a taktiež štruktúrne definovaných diglykozidov v procese transglykozylácie. V našej práci sme sa zamerali na využitie troch rôznych typov diglykozidáz na prípravu fenyletanoidných diglykozidov rastlinného a mikrobiálneho pôvodu.

i) Materiál so sofory japonskej (*Sophora japonica*) a pohánky tatárskej (*Fagopyrum tataricum*) katalyzoval transrutinozyláciu výhradne na primárny hydroxyl tyrozolu pri výťažkoch 24, resp. 35%.

ii) Pomocou robinobiozidázy z rešetliaka prečisťujúceho (*Rhamnus cathartica*) sme pripravili tyrozyl-robinobiozid, kde ako zdroj disacharidu slúžil extrakt z kvetov agátu bieleho (*Robinia pseudoacacia*) vysoko obohatený o robinín. Pri uskutočnenej preparatívnej reakcií boli pripravené 2 izoméry tyrozyl-robinobiozidu v pomere 1:8 v prospech 4-hydroxyfenetyl-β-robinobiozidu vo výťažku 23%. Enzýmová transrobinozylácia nebola doteraz v literatúre popísaná.

iii) Pomocou komerčného enzýmového preparátu Aromase H2 sa nám podarilo uskutočniť transakuminozyláciu na tyrozol. Reakcia nebola selektívna a získali sme zmes izomérov akuminozylovaného tyrozolu v pomere 1:0,9, pričom kombinovaný výťažok reakcie bol 58 %. Ide o vôbec prvú transakuminozyláciu katalyzovanú komerčným enzýmom, naviac v preparatívnom merítku.

Poďakovanie: Práca bola podporená Agentúrou na podporu vedy a výskumu (projekt APVV-18-0188), Vedeckou grantovou agentúrou (projekt VEGA 2/0111/22) a agentúrou COST (COST Action CA18224 Greenering).

Využitie odpadového glycerolu z biorafinérií pre produkciu rekombinantnej xylanázy

Mário Kočenda[1], Matej Legíň[1], Katarína Šuchová[2], Martin Rebroš[1]

1 Ústav biotechnológie, FCHPT STU, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovensko
2 Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 5807/9, 845 38, Bratislava, Slovensko

Cirkulárna ekonomika je v oblasti technológií čoraz viac skloňovaný pojem. Jej cieľom je znížiť množstvo odpadu a vedľajších produktov v rôznych sférach priemyslu. Redukcia dopadu technológií na životné prostredie si vyžaduje dôsledné plánovanie a maximálne zužitkovanie vedľajších tokov výroby, čím je možné docieliť udržateľný rast a rozvoj [1]. Jedným z praktických prístupov je využitie odpadovej rastlinnej biomasy vznikajúcej ako v poľnohospodárstve, tak aj v biorafinériách a jej premena na fermentovateľné sacharidy, biopalivá alebo cenné chemikálie. Rastlinná biomasa sa okrem lignínu skladá z celulózy a hemicelulóz, ktoré je však potrebné pre ich následné využitie hydrolyzovať. Hydrolýza hemicelulóz je však náročnejšia z hľadiska variability štruktúrnych jednotiek polymérneho reťazca u rôznych druhov rastlín, čo vedie k potrebe skúmať čoraz viac enzýmov tohto typu [2].

Xylanázy predstavujú skupinu enzýmov, ktoré sa podieľajú na degradácii xylánu, najčastejšie zastúpeného polyméru spomedzi hemicelulóz. Jeho enzymatickým štiepením dochádza k uvoľneniu xylózy, ktorá môže byť mikrobiálne utilizovaná alebo rôznych xylooligosacharidov využiteľných ako prebiotiká [3].

Táto práca bola zameraná na expresiu xylanázy pochádzajúcej z kvasinky *Sugiyamaella lignohabitans* v rekombinantnom kmeni Pichia pastoris KM71H (MutS) [4]. Cieľom práce bola intenzifikácia produkcie enzýmu v laboratórnych fermentoroch a následné posúdenie použitia odpadového glycerolu z výroby bionafty ako uhlikatého zdroja na rast mikroorganizmu a expresiu cieľového enzýmu. Aktivita xylanázy produkovanej na odpadovom glycerole bola porovnateľná s produkciou na čistom glycerole, čo umožňuje jej aplikáciu v koncepte cirkulárnej ekonomiky.

Literatúra:

[1] Guo, Z.; Yan, N.; Lapkin, A. A. Towards Circular Economy: Integration of Bio-Waste into Chemical Supply Chain. Current Opinion in Chemical Engineering. 2019, 26, 148–156.
[2] Singhvi, M. S.; Gokhale, D. V. Lignocellulosic Biomass: Hurdles and Challenges in Its Valorization. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019, 103, 9305–9320.
[3] Güler, F.; Özçelik, F. Screening of Xylanase Producing Bacillus Species and Optimization of Xylanase Process Parameters in Submerged Fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2023, 51.
[4] Šuchová, K.; Chyba, A.; Hegyi, Z.; Rebroš, M.; Puchart, V. Yeast GH30 Xylanase from Sugiyamaella Lignohabitans Is a Glucuronoxylanase with Auxiliary Xylobiohydrolase Activity. Molecules. 2022, 27 (3).

Poďakovanie: Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-22-0207.

Rekombinantné enzýmy využiteľné na vývoj antivirotík

Žigová Klaudia[1], Martin Rebroš[1]

[1] *Ústav biotechnológie, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko*

Vírusy sú obligátne intracelulárne patogény zložené z DNA alebo RNA genómu uzavretom v proteínovom obale. Vzhľadom na rýchlosť ich replikácie, mutácií a adaptácie v hostiteľských bunkách je liečba vírusových infekcií mimoriadne náročná úloha [1]. RNA-vírusy spôsobujú celosvetovo zdravotné riziko. Boj s RNA-vírusmi komplikuje aj integrácia vírusového genetického materiálu do genómu hostiteľskej bunky, čo im napomáha vyhnúť sa mechanizmom ľudskému imunitnému systému, pričom si zachovávajú rýchlosť mutácií [2]. Avšak vývoj techník v oblasti molekulárnych metód a bioinformatiky priniesol revolúciu v detekcii a dizajne nových potenciálnych antivirotík [1]. RNA-dependentná RNA polymeráza (RdRp) sa stala jednou z najatraktívnejších cieľov proteínovej povahy pre vývoj širokospektrálnych antivirotík [2].

RdRp katalyzuje predĺženie RNA templátu z 3´-konca, umožňuje tvorbu fosfodiesterových väzieb medzi ribonukleotidmi, ktorá je závislá od RNA templátu a prítomnosti dvojmocných iónov kovov [3]. Dostupnosť rekombinantnej RdRp v purifikovanej forme umožní nielen biochemickú analýzu úlohy enzýmu pri replikácii vírusu, ale aj štúdie jej štruktúry, funkcie a hľadanie jej potenciálnych inhibítorov nevyhnutných nielen voči boju s ochorením COVID-19, ale aj s inými vírusovými ochoreniami ako napríklad gastroenteritída (vírus Norwalk), hepatitída typu C, ebola a mnohé iné .

Cieľom tejto práce je intenzifikácie produkcie rekombinantnej RdRp SARS-CoV-2, ktorej gén bol klonovaný v plazmide pRSFDuet-1(nsp8-nsp7)(nsp12), ktorý bol darom od Marca Delaruea (Addgene plasmid #165451) [4] v hostiteľskom kmeni *Escherichia coli* BL21(DE3). Intracelulárne naprodukovaný enzým je následne podrobený optimalizovaným downstream procesom ako aj testovaniu aktivity, pričom práve metóda stanovenia aktivity a kinetických parametrov enzýmu je jednou z kľúčových úloh pre jej následné využitie.

Literatúra:

[1] Y. I. Asiri, A. Alsayari, A. B. Muhsinah, Y. N. Mabkhot, and M. Z. Hassan, “Benzothiazoles as potential antiviral agents,” J. Pharm. Pharmacol., vol. 72, no. 11, pp. 1459–1480, 2020, doi: 10.1111/jphp.13331.

[2] S. Pathania, R. K. Rawal, and P. K. Singh, “RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): A key target providing anti-virals for the management of various viral diseases,” J. Mol. Struct., vol. 1250, p. 131756, 2022, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131756.

Poďakovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom .

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
Postery

Vplyv α-latrotoxínu na regulačnú dráhu mTOR v bunkách AML

Martina Kšiňanová[1], Zdena Sulová[1], Albert Breier[1,2]

[1] Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Centrum Biovied, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05, Bratislava, Slovensko
[2] Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37,Bratislava, Slovensko

LPHN1 ako kľúčový receptor pre α-latrotoxín (α-LTX) je schopný iniciovať Ca^{2+} závislý, ako aj Ca^{2+} nezávislý mechanizmus pôsobenia neurotoxínu [1]. Jeho aktivácia exogénnym ligandom α-LTX spôsobuje zvýšenú transláciu a exocytózu imunitného receptora TIM3 (HAVCR2), ako aj jeho ligandu galektínu 9 (GAL9, LGALS9) a následnú fosforyláciu serín/treonín proteín kinázy mTOR (MTOR) proteínkinázou C. Signálna dráha LPHN1/PKC/mTOR/TIM3/GAL9 pravdepodobne zabezpečuje ochranu AML buniek pred NK bunkami inhibíciou vnútornej apoptotickej dráhy závislej na kaspáze 3 [2]. V bunkách akútnej myeloidnej leukémie (AML), na rozdiel od zdravých leukocytov, dochádza k expresii latrofilínu 1 (LPHN1, ADGRL1), ktorý je receptorom spriahnutým s G-proteínmi. Na základe doterajších výsledkov v súvislosti s úlohou LPHN1 v procesoch imunitného úniku leukemických buniek sme sa v práci zamerali na charakterizáciu expresie jednotlivých zložiek signálnej kaskády v bunkách AML.

V experimentálnej časti sme použili dve leukemické bunkové línie, SKM-1 a MOLM-13 a ich rezistentné varianty, SKM/VCR a MOLM/VCR, u ktorých bola navodená rezistencia selekciou parentálnych línií cytostatikom vinkristínom (VCR) a bola u nich potvrdená zvýšená expresia P-glykoproteínu (P-gp, ABCB1) na transkripčnej aj translačnej úrovni [3]. Na základe výsledkov testu metabolickej aktivity (MTT) sme vybrali dve koncentrácie α-LTX (1 a 5 nM), ktoré sme použili na kultiváciu buniek v bezsérovom médiu po dobu 24h a 48h. Expresiu génov vybraných ABC transportérov, receptorov ADGRL1, TIM3 a jeho ligandu LGALS9, ako aj kinázy MTOR na mRNA úrovni sme overili prostredníctvom RT-PCR. Potvrdili sme, že rezistencia v bunkách je spôsobená nadexpresiou génu ABCB1 a nie ABCC1. Na sledovanie zmien hladín proteínov spôsobených prítomnosťou α-LTX sme použili Western blot analýzu.

Expresiu génov ADGRL1, HAVCR2, LGALS9 a MTOR sme dokázali na úrovni mRNA vo všetkých testovaných bunkových líniách. V rezistentných variantoch bola s nadexpresiou ABCB1 na mRNA úrovni pozorovaná znížená expresia ADGRL1. Denzitometrickou analýzou PCR produktov normalizovaných voči housekeeping génu ACTB sme zistili, že α-LTX mal opačný efekt na expresiu ADGRL1 v bunkách SKM-1 a SKM/VCR. V MOLM-13 a MOLM/VCR bunkových líniách sme pozorovali klesajúci trend expresie ADGRL1. Zatiaľ čo v rezistentnom variante SKM/VCR sme zaznamenali zníženie expresie HAVCR2 v porovnaní s parentálnou líniou, v prípade bunkovej línie MOLM/VCR sme zaznamenali naopak zvýšenie expresie HAVCR2 oproti MOLM-13. α-LTX spôsobil pokles expresie génu MTOR v parentálnej línii SKM-1, ako aj rezistentnej sublínii SKM/VCR. Prítomnosť α-LTX (1nM) počas 48h zvýšila expresiu P-gp v bunkách SKM-1/VCR na transkripčnej aj translačnej úrovni.

Na základe výsledkov môžeme predpokladať, že α-LTX dokáže modulovať expresiu jednotlivých zložiek signálnej dráhy LPHN1/PKC/mTOR/TIM3/GAL9 v dôsledku potlačenia funkcie buniek IS a/alebo vytvorením autokrinnej sebaobnoviteľnej dráhy TIM3/GAL9, čo AML bunkám poskytuje výhodu a umožňuje progresiu ochorenia [1,4].

Literatúra:

[1] DAVLETOV, B. a kol. Vesicle exocytosis stimulated by α-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca2+. EMBO Journal. 1998. Vol. 17, no. 14, pp. 3909–3920. DOI 10.1093/EMBOJ/17.14.3909.
[2] GONÇALVES SILVA, I. a kol. The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. EBioMedicine. online. 2017. Vol. 22, pp. 44. DOI 10.1016/J.EBIOM.2017.07.018.

[3] IMRICHOVA, D., MESSINGEROVA, L., SERES, M., KAVCOVA, H., PAVLIKOVA, L., COCULOVA, M., BREIER, A. a SULOVA, Z., 2015. Selection of resistant acute myeloid leukemia SKM-1 and MOLM-13 cells by vincristine-, mitoxantrone- and lenalidomide-induced upregulation of P-glycoprotein activity and downregulation of CD33 cell surface exposure. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015. Vol. 77, pp. 29–39. DOI 10.1016/J.EJPS.2015.05.022.
[4] KIKUSHIGE, Y. a kol., A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemia Progression. Cell Stem Cell. 2015. 17, pp.341–352.

Poďakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektov: grant VEGA 2/0030/23 a APVV-19-0094.

Odborná komisia - kontakty

1.	Mgr. Miro Baláž, PhD.	miroslav.balaz@savba.sk
2.	RNDr. Mária Balážová, PhD.	Maria.Simockova@savba.sk
3.	RNDr. Imrich Barák, DrSc.	imrich.barak@savba.sk
4.	doc. Ing. Albert Breier, DrSc.	albert.breier@stuba.sk
5.	doc. Ing. Boris Lakatoš, PhD.	boris.lakatos@stuba.sk
6.	doc. Ing. Petra Olejníková, PhD.	petra.olejnikova@stuba.sk
7.	doc. RNDr. Peter Račay, CSc.	racay@jfmed.uniba.sk
8.	doc. Ing. Martin Rebroš, PhD.	martin.rebros@stuba.sk
9.	Ing. Zdena Sulová, DrSc.	zdena.sulova@savba.sk
10.	RNDr. Dušan Žitňan, DrSc.	dusan.zitnan@savba.sk

Sponzori Drobnicovho memoriálu

MERCK
ProScience Tech Integrované riešenia pre vedecko-výskumné laboratóriá
bioTech innovative
MGP
eppendorf
ECOMED
PIXELFEDERATION® players to players

DROBNICOV MEMORIÁL 12. ročník
5. – 7. september 2023
Hotel Lomy, Horná Ves

ISBN 978-80-974246-3-3

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

© Vydal: Centrum biovied - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Slovenská akadémia vied, Bratislava 2023