



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

1. KONFERENCIE

CENTRA EXCELENTNOSTI PRE GLYKOMIKU

„Súčasné a budúce úlohy CE pre glykomiku“



Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava,

23. máj 2012

Organizačný výbor:

RNDr. Mucha CSc. Jan.Mucha@savba.sk
Ing. Päťoprstý PhD. chempaty@savba.sk
Ing. Vlčková chemvlko@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971156 – 0 - 9



Európska únia
regionálneho rozvoja



**Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ**

Projekt:

Centrum excelentnosti pre glykomiku

ITMS: 26240120031

Prijímateľ:

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

Partneri projektu:

Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava

Ústav molekulárnej biológie Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky Slovenskej akadémie vied, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

Ústav pre výskum srdca Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

Ústav zoologie Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava

Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislavе, ul. Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

**”Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku / Projekt je
spolufinancovaný zo zdrojov ES”**

ZOZNAM PRÍSPEVKOV:

[¹H-NMR spektroskopia a dedičné poruchy metabolizmu - deficit Guanidinoacetát methyltransferázy](#)

Uhliariková I.¹, Matulová M.¹, Behúlová D.², Šalingová A.², Kolníková M.³, Šaligová J.⁴, Potočnáková L.⁴

[VPLYV CHRONICKÝCH ÚČINKOV DOXORUBICÍNU NA ODPOVEDE SRDCA POTKANA VOČI AKÚTNEJ ISCHÉMII. MECHANIZMY ZAHRNUTÉ V REALIZÁCII ÚČINKOV DOXORUBICÍNU.](#)

Barančík M., Barteková M., Ivanová M., ¹Gibalová L., ¹Šereš M., ²Dovinová I., ¹Sulová Z.

[KINASE INHIBITORS: A TOOL TO STUDY THE ROLE OF PROTEIN KINASES IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES](#)

Barančík M., Ivanová M., Šimončíková P., ¹Boháčová V., ¹Sulová Z., ¹Breier A.

[MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A ICH ÚLOHA V PROCESOCH VYVOLANÝCH DLHODOBÝM PODÁVANÍM DOXORUBICÍNU U POTKANA](#)

Ivanová M., Barteková M., Okruhlicová L., Šimončíková P., ¹Dovinová I., Barančík M.

[Účinky SMe1EC2 v oxidačnom strese izolovaných hepatocytov](#)

Bezek Š., Račková L., Kyseľová Z.

[Ovplyvnenie multidrug rezistencie v L1210/VCR bunkách pentoxifylínom.](#)

Boháčová V., ¹Barančík M., Gibalová L., ²Sedlák J., Sulová Z., Breier A.

[Expresia P-glykoproteínu v myších leukemických bunkách L1210 indukuje zmeny v expresii glykoproteínov obsahujúcich kyselinu sialovú.](#)

Bubenčíková T., Cholujová D.¹, Breier A., Sedlák J.¹, Sulová Z.

[Are yeast mannans antioxidants comparable with glucans?](#)

S. Bystrický, E. Machová

[Do glucans and mannans really scavenge hydroxyl radicals ?](#)

S. Bystrický, E. Machová

[Expresia P-glykoproteínu inhibuje aktiváciu kaspázy 3 indukovanú cisplatinou v L1210 bunkách](#)

Gibalová L¹., Šereš M¹., Labudová M²., Sedlák J³., Breier A.¹, Sulová Z.¹

[GLYCOMIMETICS OF THE INHIBITORS OF GLYCOSYLTRANSFERASES – DESIGN AND SYNTHESIS](#)

Ján Hirsch, Marek Baráth, Miroslav Koóš and Igor Tvaroška

[SYNTHESIS OF SOME PRECURSORS OF GLYCOSYLTRANSFERASE INHIBITORS](#)

Marek Baráth , Igor Tvaroška, Miroslav Koóš and Ján Hirsch

[FTIR AND NMR SPECTROSCOPIC STUDY OF MODIFIED PECTINS](#)

Anna Malovíková¹, Vlasta Sasinková¹, Iva Sroková², Lydia Rychlá³, Ivica Janigová³, Katarína Csomorová³ , Ján Hirsch¹, Anna Ebringerová¹

[Synthesis of p-nitrophenyl β-D-glycosides of disaccharide of homoxylan type and trisaccharide of 4-O-methyl-glucuronoxylan type](#)

Ján Hirsch, Marek Baráth, Miroslav Koóš and Peter Biely

[Honeys vary in the content of honeybee antibacterial peptide defensin1](#)

Juraj Majtán^{a,c}, Jaroslav Klaudiny^b , Jana Bohová^b, Mária Bartošová^d, Viktor Majtán^c

Stepwise synthesis and characterization of N-alkylsubstituted analogues of 1,6-dideoxymannojirimycin

Bohumil Steiner, Maroš Bella, Miroslav Koós

Effect of honey in wound healing process through activation of human keratinocytes

Juraj Majtan¹, Pawan Kumar², Andrew Walls³ and Jaroslav Klaudiny⁴

Biotransformation of methanol formaldehyde by bacteria isolated from clouds.

S. Husárova^c, M. Sancelme^{a,b}, M. Matulová^c and A.-M. Delort^{a,b}

Biotransformation and radical chemistry contribution in the methanol and formaldehyde degradation.

M. Vařtilingom^{a,c}, S. Husárova^{a,e}, L. Deguillaume^{c,d}, M. Traikia^{a,b}, V. Vinatier^{a,b}, M. Sancelme^{a,b}, P. Amato^{a,b}, M. Matulová^e and A.-M. Delort^{a,b}

Protónová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (¹H-NMR) a dedičné metabolické poruchy

Šalingová A.¹, Behúlová D.¹, Matulová M.², Uhliariková I.², Kolníková M.³, Šaligová J.⁴, Potočnáková L.⁴

NMR spektroskopia a jej využitie v biochemickej diagnostike

M. Matulová¹, D. Behúlová², A. Šalingová², I. Uhliariková¹

Lenalidomid v liečbe myelodysplastického syndrómu

L. Messingerová¹, A. Jonášová², L. Gibalová¹, M. Barančík³, M. Šereš¹, Z. Sulová¹, A. Breier¹

Biorecognition of various types glucoamylases with Concanavalin A.

D. Mislovičová^a, J. Masárová^b, E. Hostinová^b, J. Gašperík^b, P. Gemeiner^a

The quantitative ELLA method for the determination of dissociation constants of Con A – glycoprotein interaction

D. Mislovičová, J. Katrlík, J. Tkáč, E. Paulovičová and P. Gemeiner

The influence of different supports on application of immobilized glucose oxidase for biotransformation removal of glucose.

D. Mislovičová^a, E. Michálková^b, A. Vikartovská^a

Enzymatic Oxidation and Separation of Various Saccharides with Immobilized Glucose Oxidase

D. Mislovičová, V. Päťoprstý, A. Vikartovská

The immobilized glucose oxidase as biocatalyst for removal of D-glucose from a mixture with D-mannose.

D. Mislovičová, J. Turjan, A. Vikartovská, V. Päťoprstý

Výskyt špecifických anti-*Candida* a anti-*Saccharomyces* protilátkových izotypov u pacientiek s kandidózami

Ružena Pilišiová, Ema Paulovičová

Stanovovanie fagocytovej aktivity neutrofilov imunizovaných Balb/c myší

Ružena Pilišiová¹, Ema Paulovičová¹, Lucia Paulovičová¹, Alexander A. Karelín², Yury E. Tsvetkov², Nikolay E. Nifantiev²

Fagocytová aktivita neutrofilov indukovaná synteticky pripraveným nonaglukozid - BSA konjugátom u Balb/c myší

Ružena Pilišiová¹, Ema Paulovičová¹, Lucia Paulovičová¹, Alexander A. Karelín², Yury E. Tsvetkov², Nikolay E. Nifantiev²

Mechanizmy rezistencie patogénnych kvasiniek

Ružena Pilišiová, Ema Paulovičová

T_H DIFFERENTIATION INDUCED BY SYNTHETIC CANDIDA-DERIVED OLIGOSACCHARIDES IN BALB/C MICE

E. Paulovičová¹, L. Paulovičová¹, R. Pilišiová¹, A. A. Karelín², Y. E. Tsvetkov², N. E. Nifantiev²

Glykány bunkovej steny *C. albicans* a ich imunogénnosť

Paulovičová E.¹, Paulovičová L.¹, Pilišiová R.¹, Karelín A.A.², Tsvetkov Y-E.², Nifantiev N.E.²

Prevalencia anti - *S.cerevisiae* manánových (ASCA) protilátok u gastrointestinálnych ochorení.

E. Paulovičová,¹ A. Keleová,² M. Šimko,³ T. Hudáková,⁴

Immunobiological efficacy of *Vibrio cholerae* O1 LPS-derived moieties conjugated to BSA -glucan matrix

E. Paulovičová¹, J. Vráblová¹, P. Farkaš¹, Š. Bezek², S. Bystrický¹

Mouse peritoneal macrophages cytokine activation by *Vibrio cholerae* LPS derived immunogens.

E. Paulovičová,¹ E. Kováčová,² S. Bystrický¹

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) v diagnostike reumatoidnej artritídy

E. Paulovičová,¹ I. Viest²

Immunologically active *Candida glabrata* cell wall mannan.

Paulovičová L¹., Paulovičová E¹., Pericolini E.², Gabrielli E², Vecchiarelli A²

Immunobiological properties of Candida cell wall derived synthetically prepared oligosaccharides-protein conjugate.

L. Paulovičová¹, E. Paulovičová¹, E. Pericolini², E. Gabrielli², A. A. Karelín³, Y. E. Tsvetkov³, N. E. Nifantiev³, A. Vecchiarelli²

Serodiagnostics of vulvovaginal candidosis in atopic subjects. Engagement of *Candida albicans* complement receptor 3-related protein.

E. Paulovičová,¹ M. Hrubiško,² P. Kertys,³ H. Budáková⁴

Imunomodulačné účinky kandidového glukomanánu.

E. Paulovičová,¹ M. Pajtinka,¹ P. Kertys,² M. Hrubiško,³ T. Hudáková⁴

Glucotoxicity in Pancreatic □ Cells: Role of Protein Modifications and Proteasome

Lucia Račková^a, Tobias Jung^b, Štefan Bezek^a, Tilman Grune^b

Tunikamycin znižuje glykozyláciu P-glykoproteínu bez ovplyvnenia jeho transportnej aktivity v leukemických bunkách L1210

¹Šereš M., ²Cholujová D., ¹Bubenčíková T., ¹Breier A., ¹Sulová Z.

Identifikácia α-galaktozidázy *Cryptococcus neoformans*

Csilla Mészárosová, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Charakterizácia intracelulárnej α-galaktozidázy *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Soňa Garajová, Eva Stratilová, Nadežda Kolarova a Ján Mucha*

Identifikácia kontaminácie membránových proteínov *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou

Csilla Mészárosová, Pavel Čehulká^a, Helena Čehulková^a, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Proteóm cytozolu kvasiniek *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Pavel Řehulka^a, Helena Řehulková^a, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Vplyv zdroja uhlíka kultivačného média na indukciu glykozidáz kvasinkou *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Vplyv zdroja uhlíka kultivačného média na indukciu α -galaktozidázy kvasinkou *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-29

Csilla Mészárosová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Identifikácia indukovateľnej α -galaktozidázy kvasiniek *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou

Csilla Mészárosová, Pavel Řehulka^a, Helena Řehulková^a, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Porovnanie zdroja uhlíka kultivačného média na rast kmeňa *Cryptococcus laurentii* a indukciu povrchovej α -galaktozidázy kapsulárnym a akapsulárnym kmeňom

Csilla Mészárosová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Purifikácia intracelulárnej α -galaktozidázy *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Soňa Garajová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Zvýšená expresia P-glykoproteínu v leukemických bunkách je spojená so zmenami v glykozylácii proteínov.

Zdena Sulová, Tatiana Bubenčíková, Mário Šereš, LENKA GIBALOVÁ, ALBERT BREIER

Reactive oxygen species, oxidative liver cells injury and protective effect of pyridoindole derivative stobadin.

Bezek Š., Račkova L., Kyselova Z.

Charakterizácia fosforylačných miest v Ire1

DROPOVÁ M., SESTAK S., SCHROEDER M., MUCHA J.

Cloning, expression and biochemical characterization of three putative lysosomal α -mannosidases from *Drosophila melanogaster*

S. Šesták,^a D. Rendić,^b I. Nemčovičová,^{c,a} M. Plšková,^a I. B. H. Wilson^b and J. Mucha^a

Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of *Drosophila melanogaster* lysosomal α -mannosidase

I. Nemčovičová,^{a,b*} M. Nemčovič,^b S. Šesták,^b M. Plšková,^b I. B. H. Wilson^c and J. Mucha^b

Indukcia α -galaktozidázy kmeňa *Cryptococcus* laktózou

Eva Stratilová, Renáta Vadvertiová, Jana Guthová a Ján Mucha*

Kryštalizácia glukoamylázy Gla zo *Saccharomyces* fibuligera

Lubica Urbániková, Eva Hostinová a Juraj Gašperík

¹H-NMR spektroskopia a dedičné poruchy metabolizmu - deficit Guanidinoacetát methyltransferázy

Uhliariková I.¹, Matulová M.¹, Behúlová D.², Šalingová A.², Kolníková M.³, Šaligová J.⁴, Potočňáková L.⁴

¹Centrum glykomiky, Chemický ústav SAV, Bratislava

²Oddelenie laboratórnej medicíny, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

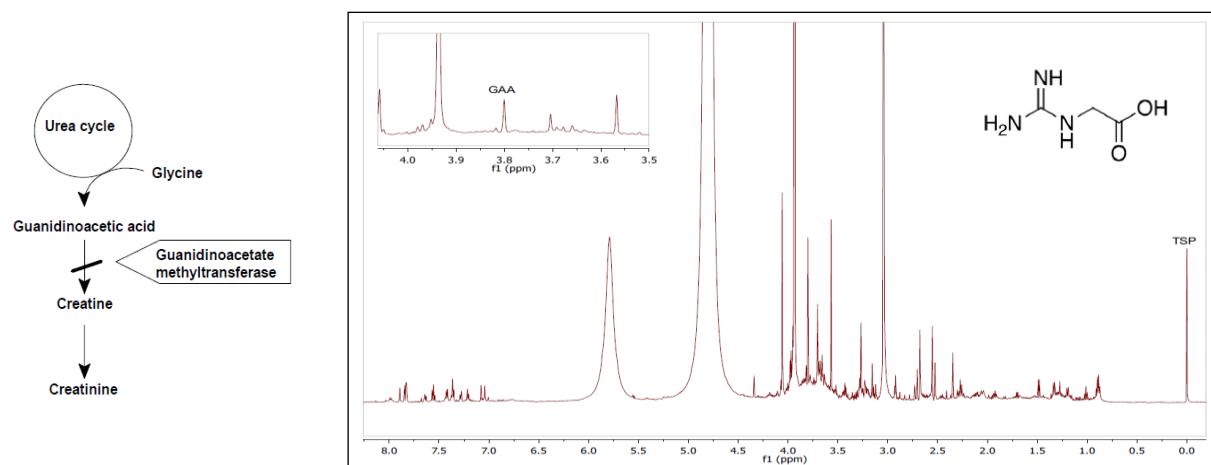
³Klinika detskej neurológie, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

⁴Detská fakultná nemocnica, Košice

Dedičné poruchy metabolizmu (DPM) sú ochorenia, ktorých príčinou je geneticky podmienená porucha funkcie enzymu či transportného proteínu. V posledných rokoch bol pozorovaný významný pokrok v diagnostike týchto ochorení. Celkový počet DMP vzrástol, v súčasnosti je známych viac než 1000 dobre definovaných ochorení a z dôvodu vzniku nových porúch v metabolických dráhach sú neustále objavované ďalšie ochorenia.

Protónová spektroskopia je špeciálna analytická technika zohrávajúca dôležitú úlohu v diagnostike niektorých dedičných ochorení, ktoré nemôžu byť stanovené inými technikami, prípadne môže v budúcnosti nahradíť niektoré konvenčné diagnostické techniky v metabolických skríningových laboratóriách.

Deficit guanidinoacetát methyltransferázy (GAMT) je pomerne novou skupinou dedičných porúch spojených so syntézou a transportom kreatínu. Príčinou tohto ochorenia sú mutácie na GAMT géne, ktorý zodpovedá za tvorbu enzymu GAMT, ktorý sa podieľa na dvojkrokovej syntéze kreatínu z aminokyselín glycín, arginín a metionín, v dôsledku čoho dochádza k zvýšenej hladine kyseliny guanidínovej (GAA) v telových tekutinách. Spoločným klinickým prejavom je mentálna retardácia, oneskorenie reči, epilepsia. Hlavným biochemickým nálezom je deficit kreatínu in vivo ¹H-NMR spektroskopiou. Včasného záchrany tejto skupiny pacientov je veľmi dôležitý, pretože suplementácia kreatínom dokáže zabrániť nežiadúcim prejavom a ochrániť mozog pacienta pred poškodením. Pacienti sú zachytávaní skríningom z moču pomocou TLC a kvantifikácia GAA sa vykonáva pomocou GC-MS/MS a najnovšie ¹H-NMR spektroskopiou. V ¹H-NMR spektrách moču pacientov zachytených skríningom boli potvrdené diagnostické signály GAA (singlet CH₂ skupiny pri 3,80 ppm). Príprava vzorky na meranie pozostáva v pridaní D₂O, interného štandardu TSP a úpravy pH vzorky.



Poděkování

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

VPLVV CHRONICKÝCH ÚČINKOV DOXORUBICÍNU NA ODPOVEDE SRDCA POTKANA VOČI AKÚTNEJ ISCHÉMII. MECHANIZMY ZAHRNUTÉ V REALIZÁCII ÚČINKOV DOXORUBICÍNU.

Barančík M., Barteková M., Ivanová M., ¹Gibalová L., ¹Šereš M., ²Dovinová I., ¹Sulová Z.

Ústav pre výskum srdca SAV; ¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV; ²Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Bratislava, Slovenská republika

Doxorubicín (DOX) patrí medzi antracyklíny a je často používaný pri chemoterapii nádorových ochorení. Systémy ovplyvňované DOX sa podieľajú nielen na realizácii jeho protinádorových, ale i toxických účinkov, a tak komplikáciou používania DOX je poškodenie viacerých orgánov (srdce, obličky, mozog, pečeň). Cieľom našej štúdie bolo charakterizovať mechanizmy zahrnuté v realizácii účinkov vyvolaných dlhodobým podávaním DOX na srdce potkana, sledovať zmeny v tolerancii sŕdc voči ischemicko/reperfúznemu poškodeniu po účinkoch DOX a skúmať možnosti ovplyvnenia srdca po účinkoch DOX pomocou flavonoidu kvercetínu.

V práci sme použili samce potkanov kmeňa Wistar, ktorým sme intraperitoneálne podávali DOX (3 týždne, výsledná dávka bola 15 mg/kg). Kontrolným zvieratám bol podávaný fyziologický roztok. Kvercetín bol podávaný perorálne (20 mg/kg hmotnosti tela) počas podávania DOX a dva týždne po ukončení aplikácie DOX. Systolický krvný tlak a frekvencia srdca boli merané metódou neinvazívnej pletysmografie. 8 týždňov od poslednej dávky DOX boli odobrané srdcia použité na sledovanie ischemickej tolerancie (model perfúzie izolovaného srdca podľa Langendorffa) alebo boli rozdelené na jednotlivé časti a ľavá komora (LK) bola použitá na biochemické analýzy. Aktivity matrixových metaloproteináz (MMP) boli stanovené želatínovou zymografiou a hladiny/aktivácia proteínov Western blot analýzou s využitím špecifických protilátok.

Zistili sme, že u zvierat, ktorým bol podávaný DOX dochádzalo k zvyšovaniu systolického tlaku krvi a tieto účinky DOX boli redukované aplikáciou kvercetínu. Pri sledovaní zmien v hladinách ABC transportéra P-glykoproteínu (P-gp) sme zistili, že 8 týždňov po aplikácii je v LK srdca zvierat ovplyvnených DOX zvýšený obsah mRNA, ktorá je produktom génu mdr1B. Ide o gén, ktorý kóduje proteín ABCB1B, t.j. P-gp. Za účelom zistenia úlohy niektorých proteínskych kináz (MAPK, PI3K/Akt) v procesoch súvisiacich s vývinom účinkov DOX sme sledovali v LK zmeny v hladinách a aktiváciu týchto proteínov. Zistili sme, že DOX nemal významný vplyv na hladiny a aktiváciu extracelulárnych signálom-regulovaných kináz a c-Jun-N-terminálnych kináz. V prípade Akt kinázy sme zistili, že chronické účinky pôsobenia DOX boli po 8 týždňoch spojené so zvýšenou špecifickou fosforyláciou Akt kinázy na Ser473, pričom táto fosforylácia odráža aktiváciu tohto enzymu.

Vplyv chronických účinkov DOX na odpovede srdca voči akútnej ischémii sme sledovali na modeli izolovaného perfundovaného srdca potkana. Významné zmeny v ischemickej tolerancii sme pozorovali u zvierat, ktorým bol podávaný kvercetín, pričom k významnému zlepšovaniu postischemickej obnovy parametrov kontraktility (+dP/dtmax a -dP/dtmax) a LVDP dochádzalo hlavne u potkanov ovplyvnených DOX. Z hľadiska

sledovania molekulárnych mechanizmov bolo zaujímavé zistenie, že zmeny v ischemickej tolerancii boli spojené so zvýšením aktivácie Akt kinázy a znížením proteínových hladín a aktivít MMP-2.

Výsledky poukazujú na to, že v nami sledovanom modeli pôsobenia DOX na srdce potkanov môže mať aplikácia kvercetínu pozitívne účinky, ktoré sa však vo väčšej miere prejavujú až po vystavení súdc akútnej ischemicko/reperfúznej záťaži. Mechanizmy zodpovedné za tento ochranný účinok môžu zahŕňať aktiváciu signálnej dráhy Akt kinázy, potláčanie MMP-2 a moduláciu ABC transportérov (P-glykoproteín).

Poděkovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

KINASE INHIBITORS: A TOOL TO STUDY THE ROLE OF PROTEIN KINASES IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES

Barančík M., Ivanová M., Šimončíková P., ¹Boháčová V., ¹Sulová Z., ¹Breier A.

Institute for Heart Research SAS; ¹Institute of Molecular Physiology and Genetics SAS,
Bratislava, Slovakia

Protein kinase pathways, such as MAPKs and PI3K/Akt, have different functions in the animal cells and they play an important role in the stress responses and in processes of cell survival and death. Targeting of components of these pathways with pharmacological agents of high potency and specificity can help to establish the impact of specific kinases on cellular functions. Pharmacological inhibition of MAPK and PI3K/Akt kinase signaling we used for assessing of the role of specific protein kinases in modulation of cardiac function during ischemia/reperfusion and in processes of pathological remodeling in cellular and animal models. Results of studies showed that activation of ERKs, members of MAPK family, plays

an important positive role in preventing of myocardial necrosis and apoptosis. This impression was supported by studies using specific ERK pathway inhibitors, like PD98059 and U0126. The role of p38-MAPK pathway was studied using pharmacological inhibitor of

this kinase pathway, pyrimidyl imidazole derivative SB203580 (SB). In rat hearts the treatment with SB reversed the protective effects of ischemic preconditioning (IP)-mediated cardioprotection. However, these effects of SB were not observed in pig myocardium. The contradictive results suggest that p38-MAPK has ambiguous character in heart with both protective and detrimental effects. LY294,002 (LY) is a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway which is a key signaling system implicated in cell survival and metabolic control in various cell types. The application of LY in rat myocardium was connected with inhibition of IP-mediated Akt kinase activation and modulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activities. The obtained results point to possible relationship between Akt kinase and modulation of MMP-2 activities in cardioprotective mechanisms of IP. To the relationship between Akt kinase pathway and modulation of MMP-2 activities point also data obtained in rat hearts influenced by doxorubicin. Application of LY was also found to reduce the degree of vincristine (VCR) resistance in L1210/VCR cells and the drug resistance reversal effects of LY were accompanied with its influence on VCR-induced apoptosis.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A ICH ÚLOHA V PROCESOCH VYVOLANÝCH DLHODOBÝM PODÁVANÍM DOXORUBICÍNU U POTKANA

Ivanová M., Barteková M., Okruhlicová L., Šimončíková P., ¹Dovinová I., Barančík M.

Ústav pre výskum srdca SAV; ¹Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Bratislava, Slovenská republika

Antracyklín doxorubicín (DOX) je liečivo často používané pri chemoterapii nádorových ochorení. Komplikáciou pri podávaní DOX sú jeho toxické účinky na srdce spojené s vývinom kardiomyopatií, ktoré často vedú až k zlyhaniu srdca. Cieľom našej štúdie bolo sledovať zapojenie matrixových metaloproteináz (MMP) do procesov vyvolaných dlhodobým podávaním DOX na srdce potkana. V práci boli použité potkany kmeňa Wistar, ktorým bol intraperitoneálne podávaný DOX. Antracyklín bol aplikovaný v 7 dávkach a jeho celková kumulatívna bola 15 mg/kg hmotnosti. Kontrolnej skupine bolo podaných 7 dávok fyziologického roztoku. Po poslednej dávke DOX boli potkany ponechané na žive ešte 4 alebo 8 týždňov.

U potkanov, ktorým bol aplikovaný DOX, boli na úrovni ľavej komory (LK) pozorované viaceré štrukturálne zmeny, ktoré sú charakteristické aj ako markery kardiotoxicity antracyklínov. Zistili sme, že DOX indukoval heterogénne subcelulárne zmeny charakterizované degeneráciou a/alebo stratou myofibríl, cytoplazmatickou vakuolizáciou kardiomyocytov, štrukturálnou disorganizáciou extracelulárneho priestoru v LK. Všetky zmeny sa objavovali už 4 týždne po podávaní DOX, ich intenzita a závažnosť bola ešte viac zvýraznená po 8 týždňoch. U potkanov, ktorým bol aplikovaný DOX, boli, predovšetkým po 8 týždňoch, pozorované výrazné štrukturálne zmeny na úrovni extracelulárnej matrix. Tieto štrukturálne zmeny pozorované na úrovni LK po dlhodobom pôsobení DOX pravdepodobne súvisia so zistenou zvýšenou aktivitou 72-kDa formy matrixovej metaloproteinázy-2 (MMP-2). K významnému zvýšeniu aktivity došlo u zvierat DOX-8, pričom zmeny v aktivite neboli spojené so zmenami v proteínových hladinách tohto enzymu, ani so zmenami v hladinách endogénneho tkanivového inhibítora MMP – TIMP-2. Zmeny v aktivitách tkanivovej 72-kDa MMP-2 boli spojené taktiež so zmenami v aktivitách MMP uvoľnených do cirkulácie. Zistili sme, že v plazme zvierat ovplyvnených účinkami DOX dochádza k zvýšeniu aktivít 72-kDa MMP-2, ako aj MMP-9, a to už 4 týždne po aplikácii DOX, pričom účinok DOX na zvyšovanie aktivít cirkulujúcich MMP pretrvával aj po 8 týždňoch. K aktivácii 72-kDa formy MMP-2 dochádza predovšetkým účinkom radikálov a preto bolo z hľadiska sledovania mechanizmov podielajúcich sa na účinkoch DOX v rámci LK dôležitým zistenie, že chronické účinky DOX boli 8 týždňov po ukončení jeho podávania spojené so zníženou aktivitou superoxid dismutázy, dôsledkom čoho bol viac ako 2-násobný nárast hladiny superoxidu. Naviac, už 4 týždne po aplikácii DOX (DOX-4) došlo v LK k indukcii proteínovej expresie indukovanateľnej formy NO syntázy (NOS2) a tieto zmeny pretrvávali aj po 8 týždňoch. Pozorovali sme, že 8 týždňov po podaní poslednej dávky DOX bol významne znížený taktiež celkový antioxidačný status buniek tkaniva LK.

Získané výsledky poukazujú na zapojenie matrixových metaloproteináz, hlavne 72-kDa MMP-2, do procesov vyvolaných účinkami dlhodobého pôsobenia DOX. Javí sa tiež, že pozorované zmeny v aktivite 72-kDa formy MMP-2 po aplikácii DOX súvisia so zistenými

zvýšenými hladinami superoxidu a zvýšenou produkciou oxidu dusnatého (v dôsledku pozorovanej indukcie NOS2).

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Účinky SMe1EC2 v oxidačnom strese izolovaných hepatocytov

Bezek Š., Račková L., Kysel'ová Z.

Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV
Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava

Úvod: Pečeň je hlavným orgánom biotransformácie organizmu človeka a zvierat. Významnou mierou sa podieľa na metabolizme endogénnych a exogénnych látok vrátane liekov a iných xenobiotík. Pečeň zohráva dôležitú úlohu v metabolizme základných živín organizmu, bielkovín, sacharidov a lipidov, ale má aj dôležitú úlohu v metabolických a detoxikačných procesoch organizmu.

V pečeni sa tvoria a detoxikujú reaktívne formy kyslíka (RFK). RFK sú vo všeobecnosti nestále, vysoko reaktívne a energetické molekuly, ktoré sú krátke schopné samostatnej existencie. RFK alebo voľné radikály sa v biologickom systéme môžu tvoriť prooxidatívnymi enzýmovými systémami, lipidovou oxidáciou, oziarením, zápalom, chemickými látkami znečistujúcimi ovzdušie atď. Klinické štúdie potvrdili, že reaktívne formy kyslíka zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze degeneratívnych a zápalových ochorení, aterosklerózy, astmy, reumatoidnej artritídy a nádorových ochorení.

Reaktívne metabolity kyslíka spôsobujú poškodenie biologicky významných molekúl prevažne tým, že ich oxidujú. Pre aeróbny život je charakteristická neustála tvorba a detoxikácia. Zachovanie integrity bunky a jej fyziologických funkcií vyžaduje rovnováhu systémov prooxidant-antioxidant. Trvalé narušenie tejto rovnováhy v prospech prooxidantov má za následok hromadenie oxidačne poškodených biomakromolekúl, čo môže vyústiť do patologického stavu. Takéto trvalé narušenie rovnováhy sa nazýva oxidačný stres. Oxidačný stres je charakterizovaný ako porušenie rovnováhy medzi vznikom RFK a schopnosťou biologického systému zneškodňovať vzniknuté reaktívne medziprodukty, prípadne odstraňovať výsledné poškodenia bunky. Antioxidanty sú látky, ktoré budú priamo alebo nepriamo chrániť bunky proti nepriaznivým účinkom xenobiotík, liečiv, karcinogénov a toxicických radikálových reakcií.

Cieľom práce bolo sledovať účinky stobadínového derivátu SMe1EC2 v oxidačnom strese, ktorý sa idukoval tert-butylhydroperoxidom (t-BHP).

Metodika: Hepatocyty sa izolovali dvojstupňovou perfúziou enzymom kolagenázou. V experimentoch sa použili potkany-samce kmeňa Wistar, ktorým sa v pentobarbitalovej anestéze otvorila brušná dutina v linea alba. Po heparinizácii do véna iliolumbalis dextra sa kanylovala portálna žila a pečeň sa pripojila na mimotelový perfúzny systém a in situ sa perfundovala perfúznym bezkalciovým roztokom. Po 10-12 minútovnej otvorenej jednocestnej perfúzii sa pečeň perfundovala perfúznym médium s obsahom 0,05% enzymu kolagenázy, ktorý v priebehu 15 minút rozpustil intersticiálny kolagén a hepatocyty sa uvoľnili do média. Parenchymové hepatocyty sa získali trojnásobnou diferenciálnou centrifugáciou a premývaním. Primárna suspenzia izolovaných hepatocytov sa nariedila na zásobnú koncentráciu $40 \cdot 10^6/\text{ml}$ a držala sa na ľade až do použitia v experimente.

Hepatocyty sa inkubovali v CO_2 inkubátore pri teplote 37°C na kultivačných platničkách na rotačnej trepačke v celkovom objeme Krebs-Henseleitovho roztoku 5 ml. Ako modelová látka sa na indukcii oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov použil t-BHP, ktorý sme aplikovali v koncentráciach 0,5 mM; 1,0 mM a 2,0 mM. Pyridoindolový derivát stobadínu SMe1EC2 sa aplikoval 10 minút pred podaním t-BHP v koncentráciach

0,01; 0,1 a 1,0 mM. Po 60 minútovej inkubácii sa z testovanej suspenzie odobral aliquot 1 ml na centrifugáciu. V supernatante sa stanovil intracelulárny enzým laktátdehydrogenáza (LDH). Vitalita hepatocytov sa stanovila kombinovaným fluorescenčným farbením zmesou akridín-oranž/etídium bromid a preparáty sa snímali mikroskopickou digitálnou kamerou Moticam 1000.

Výsledky a diskusia: Ako modelová látka sa na indukciu oxidačného stresu v systéme izolovaných hepatocytov použil tert-butylhydroperoxid (t-BHP). Referencie v odbornej literatúre udávajú rôzne koncentrácie, ktoré sa používajú na vyvolanie oxidačného stresu. Z tohto dôvodu sa v tejto práci použili t-BHP v koncentráciách 0,5 mM; 1,0 mM a 2,0 mM. Záznamy fluorescenčnej mikrografie poukazujú na výrazné zmeny prežívania hepatocytov vplyvom pôsobenia t-BHP v priebehu 60 minútovej inkubácie. Vitalita kontrolnej suspenzie hepatocytov bola vždy viac ako 95%, po 60 minútovej inkubácii pri koncentrácií 0,5 mM t-BHP sa znížila na 78%, pri konc. 1,0 mM t-BHP sa znížila na 60% a pri konc. 2,0 mM t-BHP sa znížila na 52 %. Predinkubáciou hepatocytov stobadínovým derivátom SMe1EC2 sa v závislosti od koncentrácie znížilo uvoľňovanie LDH:

0,01 mM – 4,90 µkat/l

0,1 mM – 3,49 µkat/l

1,0 mM – 1,15 µkat/l

Protektívny účinok SMe1EC2 v oxidačnom strese izolovaných hepatocytov sa prejavil:

- zvýšením vitality izolovaných hepatocytov
- znížením uvoľňovania LDH

Záver:

Z výsledkov priaznivého pôsobenia pyridoindolového derivátu stobadínu látikou SMe1EC2 v systéme izolovaných hepatocytov potkana v oxidačnom strese indukovanom t-BHP a z výsledkov, ktoré sa získali v tejto práci možno vyvodíť záver, že hepatoprotektívne účinky stobadínového derivátu SMe1EC2 spočívajú v inhibícii oxidačného poškodenia.

Systém izolovaných hepatocytov sa ukázal vhodným systémom na štúdium funkčných glykomických štruktúr.

Podakovanie

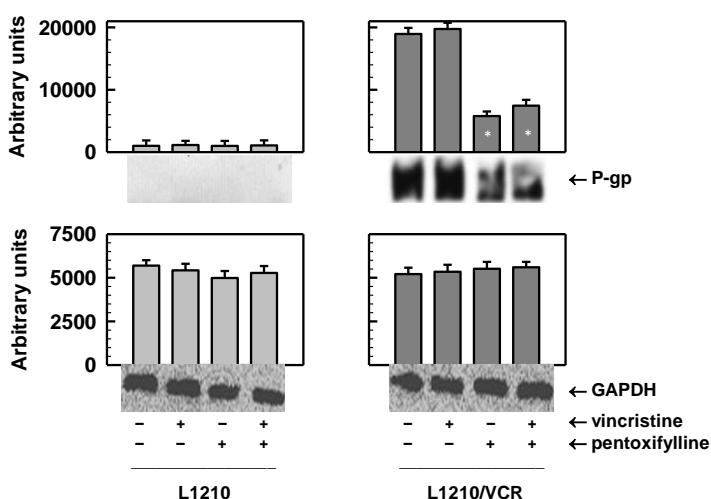
Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Ovplyvnenie multidrug rezistencie v L1210/VCR bunkách pentoxifylínom.

Boháčová V., ¹Barančík M., Gibalová L., ²Sedlák J., Sulová Z., Breier A.

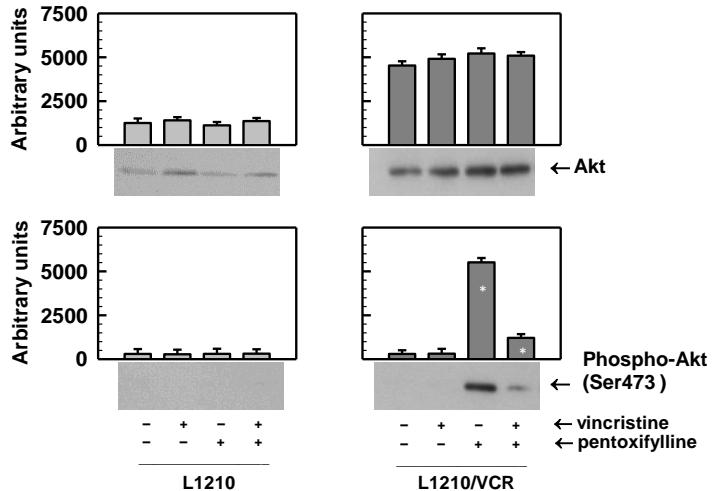
Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, ¹Ústav pre výskum srdca SAV, ²Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Viacieková (multidrug) rezistencia predstavuje fenomén, vďaka ktorému sa neoplastické bunky stávajú rezistentné voči pôsobeniu nielen jedného liečiva, ale širokej škále liečív s rôznou štruktúrou, farmakologickými vlastnosťami a mechanizmom účinku. Jednou z najčastejších príčin je zvýšená expresia integrálneho proteínu, nachádzajúceho sa v plazmatickej membráne: P-glykoproteínu (P-gp). P-gp, ktorý patrí medzi ABC transmembránové transportéry, funguje ako energeticky závislá efluxná pumpa a v multidrug rezistentných bunkách sa podieľa na eliminácii cytotoxických látok z bunky. Transportnú funkciu Pgp možno ovplyvniť skupinou látok, nazvaných chemosenzitizéry, medzi ktoré patria aj deriváty xantínov. V predchádzajúcich prácach bola zistená schopnosť metylxantínu – pentoxifylínu (PTX) potláčať rezistenciu u P-gp pozitívnej L1210/VCR bunkovej línie. Pre lepšie objasnenie účinku PTX sme sledovali jeho vplyv na enzymy zohrávajúce dôležitú úlohu v regulácii apoptotických odpovedí bunky na modeli leukemických buniek L1210 (senzitívna, P-gp negatívna línia) a L1210/VCR (rezistentná, P-gp pozitívna línia). Zistili sme, že pôsobenie PTX (0.1 mmol/l) vyvoláva downreguláciu P-gp v L1210/VCR na proteínovej úrovni, zvyšuje citlivosť P-gp pozitívnej línie na vinkristín (Obr. 1).



Obr. 1. Ovplyvnenie hladín P-gp bunkovej línie L1210/VCR pentoxifylínom (100 µmol/L) v prítomnosti (1.2 µmol/L) a neprítomnosti VCR, počas 24 hodín. Proteínové hladiny P-gp a GAPDH boli stanovené metódou Western blotu, použitím špecifických protilátok.

Tento fakt koreluje so stimuláciou apoptózy (detegovaná Annexin V-FITC Apoptosis kitom) a proteolytickou aktiváciou kaspázy-3 a kaspázy-9 (určená Western blot analýzou). Zistili sme, že prítomnosť PTX ovplyvňuje aktiváciu Akt kinázy. Počas 24 h došlo k výraznému zvýšeniu fosforylovanej formy Akt kinázy, čo sa však nepotvrdilo, ak bol v médiu prítomný aj vinkristín (Obr. 2).



Obr. 2. Vplyv VCR a PTX na expresiu a špecifickú fosforyláciu Akt kinázy. Bunkové línie boli ovplyvnené PTX (100 $\mu\text{mol/L}$) v prítomnosti (1.2 $\mu\text{mol/L}$) a neprítomnosti VCR, počas 24 hodín. Expressia a špecifická fosforylácia (na Ser 473) Akt kinázy bola stanovená metódou Western blotu, použitím špecifických protilátok.

U rezistentných buniek L1210/VCR bolo pozorované väčšie uvoľňovanie matrixových metaloproteináz, hlavne MMP-2, v porovnaní so senzitívnymi L1210 bunkami. Pôsobením PTX došlo k jeho zníženiu, čo sme potvrdili pomocou zymografie a elektroforézy. Uvedené údaje naznačujú, že PTX ovplyvňuje citlivosť rezistentnej línie L1210/VCR na vincristín downreguláciou P-gp, stimuláciou apoptózy a moduláciou uvoľňovania MMP.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Expresia P-glykoproteínu v myších leukemických bunkách L1210 indukuje zmeny v expresii glykoproteínov obsahujúcich kyselinu sialovú.

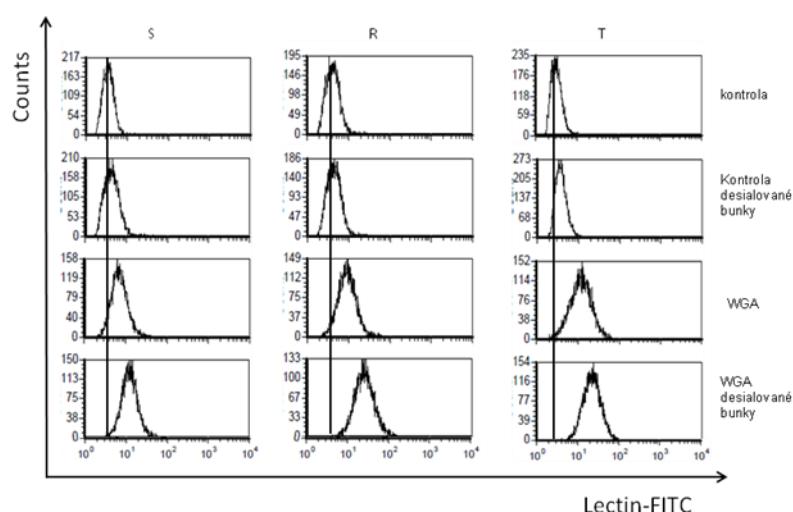
Bubenčíková T., Cholujová D.¹, Breier A., Sedlák J.¹, Sulová Z.

Ústav molekulárnej fyziologie a genetiky, ¹Ústav experimentálnej onkologie

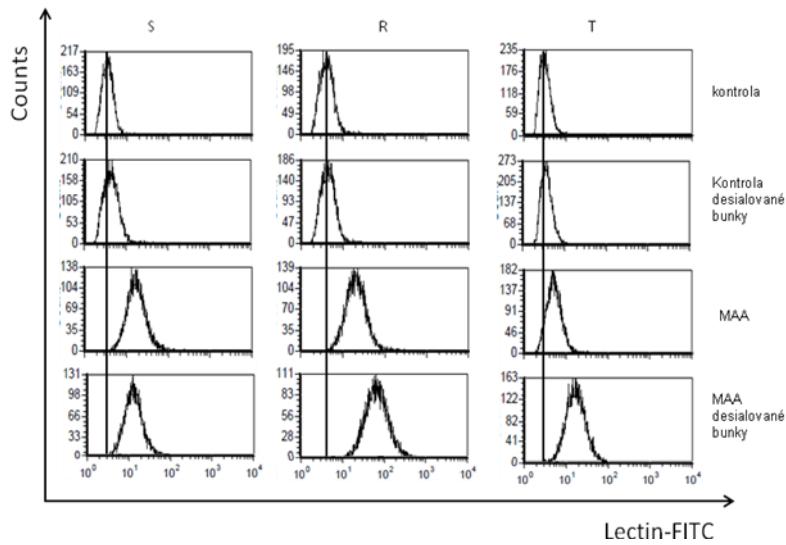
Slovenská akadémia vied, Bratislava

tatiana.kurucova@savba.sk

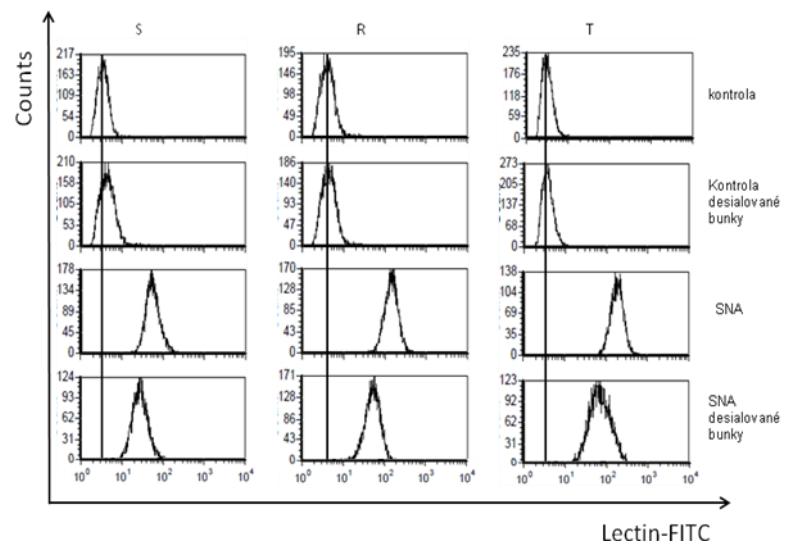
Multidrug rezistencia (MDR) neoplastických buniek je závažným problémom pri chemoterapii nádorových ochorení. Častou príčinou rozvoja MDR je expresia P-glykoproteínu (P-gp). P-gp je membránový proteín, transportujúci cytostatiká von z bunky, čím znižuje koncentráciu liečiv v bunke a tým spôsobuje zlyhávanie chemoterapie. Našim modelom P-gp sprostredkovanej MDR je myšia leukemická línia L1210/VCR získaná postupnou adaptáciou na vinkristín (R) a línia získaná stabilou transfekciou plazmidom nesúcim gén pre ľudský P-gp (T). V predchádzajúcich prácach sme zistili pokles hlavného substrátu transglykozylačných reakcií, UDP-sacharidov, v rezistentných bunkách. Pozorovali sme aj zmeny v spektri a hladinách glykoproteínov na povrchu buniek. V tejto práci sme sa zamerali na študovanie interakcie lektínov so špecifickou väzbou na kyselinu sialovú na povrch buniek L1210. Testovali sme tri lektíny – WGA (*Triticum vulgaris* lektín), MAA (*Maackia amurensis* lektín) a SNA (*Sambucus nigra* lektín). Zo všetkých testovaných lektínov len WGA mal výraznejší toxickej efekt a to hlavne na P-gp pozitívne bunky (R,T). Výraznejšiu aglutináciu pozorujeme u R a T buniek v porovnaní s parentálnou líniou buniek, ktorá neexprimuje P-gp (S) a to všetkými troma lektínmi. Pomocou lektín blotov s príslušnými lektínmi sme zaznamenali zmeny v hladinách a tiež spektre glykoproteínov v membránových frakciách izolovaných z S, R a T buniek. Zistili sme výraznejšiu väzbu WGA lektínu na R a T bunky v porovnaní s S bunkami, výraznejšie rozdiely vo väzbe MAA a SNA sme nepozorovali. Desialidácia intaktných buniek neuraminidázou z *Vibrio cholerae* ovplyvnila väzbu lektínov len minimálne (obr.1, obr.2, obr.3). Predinkubácia buniek so sialyl laktózou znižila interakciu lektínov s povrhom buniek podstatne výraznejšie ako predinkubácia s kyselinou sialovou (obidve spomínané látky sú prirodzené ligandy testovaných lektínov).



Obr.1: Sledovanie väzby lektínu WGA na povrch buniek po desialidácii



Obr.2: Sledovanie väzby lektínu MAA na povrch buniek po desialidácii



Obr.3: Sledovanie väzby lektínu SNA na povrch buniek po desialidácii

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Are yeast mannans antioxidants comparable with glucans?

S. Bystrický, E. Machová

Institute of Chemistry, Department of Immunochemistry of Glycoconjugates, Centre of Excellence Glycomed, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovakia

Interest is given to polysaccharides isolated from various sources as natural antioxidants. Despite of that, mechanism of antioxidant abilities of polysaccharides has not been elucidated. Mostly studied water-soluble derivative, carboxymethyl β -D-glucan, protected phosphatidylcholine liposomes against peroxidation induced by OH \cdot radicals. Also, the radical-scavenging properties of carboxymethyl β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy were described. However, failure of carboxymethyl β -D-glucan to inhibit oxidative DNA damage induced by OH \cdot radicals was also found out. Only a few information concerning the antioxidant activities of the second major surface yeast polysaccharide, mannan, were published.

The presented contribution is focused on the study of antioxidant abilities of surface mannans obtained from *C. albicans* serotype A, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and *S. cerevisiae* using liposomes as model for lipid oxidation. This assay includes the peroxidation of phosphatidylcholine liposomes caused by OH \cdot radicals produced via Fenton's reaction in the presence of mannans. As comparing glucan polysaccharides, carboxymethyl β -D-glucan from *S. cerevisiae* (CM-glucan) and pullulan (α -1,4-; α -1,6-glucan) were monitored.

Table 1: The characterization of mannan and glucan polysaccharides and their IC₂₅ values

Sample	IC ₂₅ [mg/mL]	M _{peak} x 10 ⁴	Protein [%]	Monosaccharide composition [%]			
				Man	Glc	Gal	GlcNAc
Mannan <i>C. albicans</i> , ser. A	6,3	19,3	4,9	85,4	5,9	8,7	tr.
Mannan <i>C. tropicalis</i>	7,1	7,3	0,6	98	1,1	0,9	tr.
Mannan <i>C. dubliniensis</i>	21,3	7,5	0,9	98,3	1	0,7	tr.
Mannan <i>S. cerevisiae</i>	43,1	3,4	1,1	96,5	2,6	0,9	tr.
Pullulan	n.d.	4,9	0	100	0	0	0
CM-glucan <i>S. cerevisiae</i>	6,5	32,5	3,9	2,5	97,5	0	0

IC₂₅ - the concentration of saccharides that provides 25% protection of liposomes against peroxidation with OH \cdot radicals

n.d.* - antioxidant activity did not reached the IC₂₅ value up to maximum concentration used

tr. - traces of GlcNAc from N-acetylchitobiose bridge

The results revealed the considerable effect of all studied mannans in the protection of liposomes against OH \cdot radicals. Mannans protected the peroxidation of liposomes in a concentration-dependent manner. It seems that the percent of AOA grew with increasing concentrations as well as the molecular weights of mannans (Table 1). The largest mannan prepared from *C. albicans* serotype A ($M_p \sim 193$ kDa) was the most efficacious antioxidant of liposome peroxidation (Fig. 1A, upper line). The smallest mannan from *S. cerevisiae* ($M_p \sim$

34 kDa) prevented the peroxidation of liposomes less than others mannans (Fig. 1A, lower line). The IC₂₅ values of mannans proportionally increased with decreasing of their sizes (Table 1). The antioxidant activity of CM-glucan ($M_p \sim 325$ kDa; IC₂₅ = 2.1 mg/mL) was similar to that of *C. albicans* serotype A mannan, while pullulan did not reached the IC₂₅ at used concentrations (Table 1).

Polysaccharides are able to coat the surface of liposomes by strong nonspecific binding and protective polysaccharide shield on liposome surface builds up. We suppose that the reason of their antioxidant effect could be the protective shield that protects them from attack of OH· radicals produced in surroundings. It seems that the polysaccharides containing flexible β-linkages are most effective protector of liposome peroxidation that these ones containing only α-linkages.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Do glucans and mannans really scavenge hydroxyl radicals ?

S. Bystrický, E. Machová

Institute of Chemistry, Department of Immunochemistry of Glycoconjugates, Centre of Excellence Glycomed, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovakia

According to actual notion the antioxidant abilities of polysaccharides are in consequence of quenching of OH[·] radicals. To verify this supposition, the radical scavenging activities of selected polysaccharides (*C. albicans* serotype A and *S. cerevisiae* mannans as well as CM-glucan and pullulan) were investigated by commonly used 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[·]) assay and compared with standard antioxidants (ascorbic acid, α-tocopherol and glutathione). Analyses were performed at triplicate. Scavenging ability (%) = [(A₀ - A_{sample})/A₀] x 100, where A₀ was the absorbance of control (without sample). Ascorbic acid (0.003; 0.007; 0.013 mg/mL), α-tocopherol (0.009; 0.028; 0.046 mg/mL) and glutathione (0.006; 0.029; 0.057 mg/mL) were used as reference scavengers of DPPH[·] radicals.

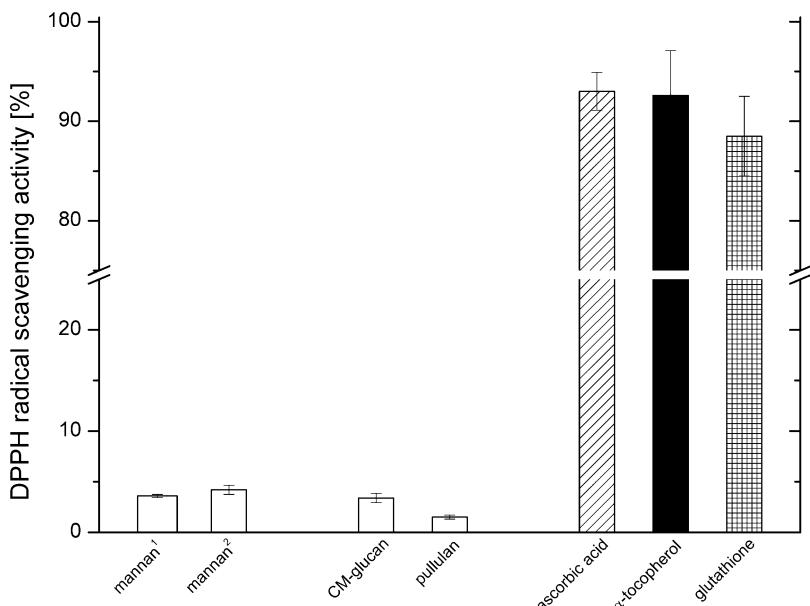


Fig. Scavenging activities of *S. cerevisiae* mannan (mannan¹), *C. albicans* serotype A mannan (mannan²), CM-glucan, pullulan, and natural antioxidants - ascorbic acid, α-tocopherol and glutathione using DPPH[·] assay.

Despite of wide concentration range of polysaccharides, their scavenging abilities did not exceed 4.2 % (2.7 mg/mL of *C. albicans* serotype A mannan) resp. 3.4 % (2.7 mg/mL of CM-glucan). Natural antioxidants used as positive controls quenched at optimal concentrations 93 % of DPPH[·] radicals (ascorbic acid), 92.6 % (α-tocopherol) and 88.5 % (glutathione).

Seeing that polysaccharides did not scavenge OH[·] radicals, we suppose that the reason of their antioxidant effect observed in some assay could be the formation of shields that protect detector molecules from attack of OH[·] radicals produced in surroundings.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Expresia P-glykoproteínu inhibuje aktiváciu kaspázy 3 indukovanú cisplatinou v L1210 bunkách

Gibalová L¹., Šereš M¹., Labudová M²., Sedlák J³., Breier A.¹, Sulová Z.¹

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava, Slovensko

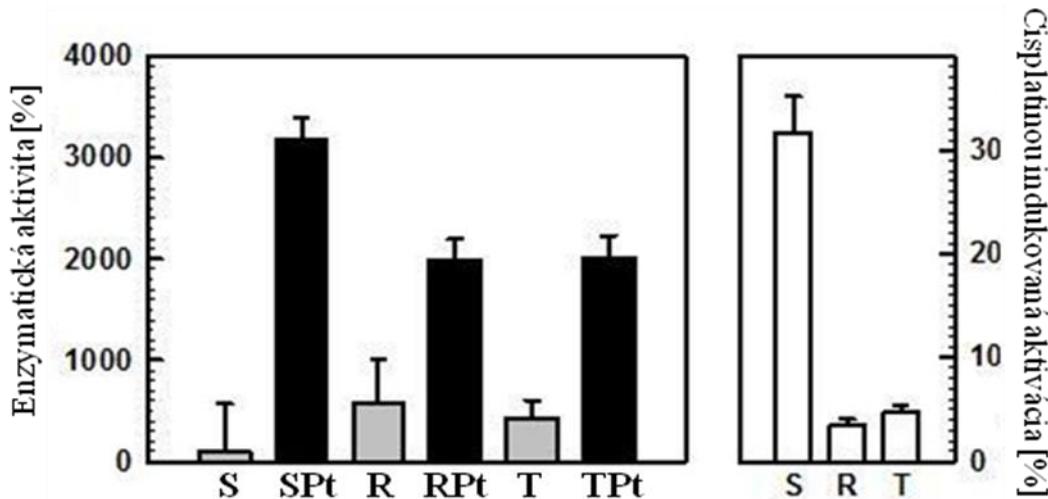
²Virologický ústav SAV, Bratislava, Slovensko;

³Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava, Slovensko

Multidrug rezistencia (MDR) je jav, kedy sa bunky stanú odolné nielen voči látke, ktorá túto rezistenciu vyvolala, ale aj voči iným, štruktúrne a funkčne odlišným substanciám (substrátom). Jedným z najčastejšie študovaných mechanizmov MDR je transportná pumpa, P-glykoproteín (P-gp), ktorého expresia a aktívita predstavuje reálnu prekážku pri účinnej chemoterapii.

Zamerali sme sa na sledovanie prípadných rozdielov v apoptóze indukowanej cisplatinou (CisPt, nie je substrátom pre P-gp) medzi P-gp pozitívnymi a P-gp negatívnymi L1210 bunkami. P-gp pozitívne bunky sme získali dlhodobou adaptáciou parentálnych L1210 buniek na cytostatikum vinkristín (R bunky) alebo transfekciou parentálnych buniek génom pre ľudský P-gp (T bunky). P-gp pozitívne bunky sa vo viacerých biochemických aspektoch líšia od parentálnych (S) buniek.

Zistili sme, že R a T bunky sú rezistentnejšie na prítomnosť CisPt, a táto rezistencia nie je ovplyvnená inhibítormi P-gp, verapamilom. Bunky po aplikácii CisPt vstupujú do apoptózy, jej typické prejavy ako napr. DNA fragmentácia a ultraštrukturálne zmeny sme pozorovali vo všetkých typoch buniek, avšak cisPt indukuje rýchlejší a výraznejší vstup do apoptózy práve v P-gp negatívnych bunkách, než v P-gp pozitívnych. CisPt vyvoláva výraznejšiu aktiváciu kaspázy 3 v S bunkách, než v R a T bunkách (obr. 1).



Obr. 1- Hladina aktívnej kaspázy 3 po 24 hodinovom pôsobení 10 mg/l cisplatiny (index Pt) v S, R a T bunkách.

CisPt neindukuje zmeny v hladine P-gp. Porovnateľné množstvo proapoptotického proteínu Bax a antiapoptotického proteínu Bcl-2 sme pozorovali v S, R a T bunkách, avšak v

prítomnosti CisPt nastalo výraznejšie zníženie proteínu Bcl-2 v S bunkách, na rozdiel od R a T buniek.

Všetky vyššie spomenuté zistenia nám indikujú, že P-gp, nezávisle od jeho transportnej aktivity, vyvoláva zmenu v regulačných dráhach buniek, čo vyvolá čiastočnú stratu citlivosti na cisplatinu.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

GLYCOMIMETICS OF THE INHIBITORS OF GLYCOSYLTRANSFERASES – DESIGN AND SYNTHESIS

Ján Hirsch, Marek Baráth, Miroslav Koóš and Igor Tvaroška

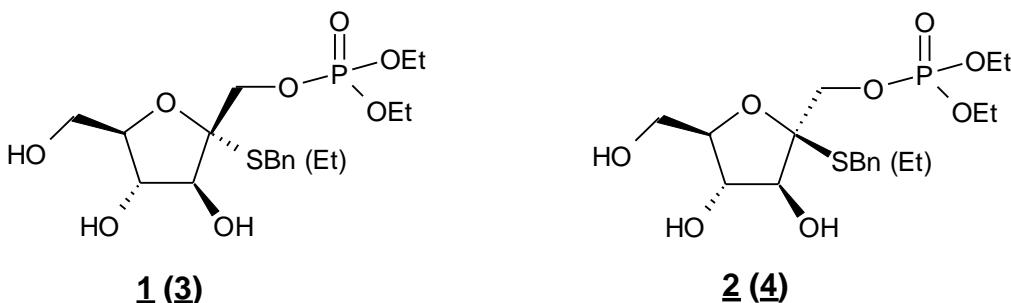
Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

E-mail: chemhirs@savba.sk

Glycosyltransferases (GT's) represent an important group of enzymes involved in the biosynthesis of *N*- and *O*-linked complex oligosaccharides of glycoproteins providing the formation of a new glycosidic linkage. They cause significant structural variations in biological systems and thereby modulate intermolecular interactions by steric influence and lectin bindings. On the other hand, the part of these structural variations, raised by catalytic effect of GT's, contribute to various mammalian diseases that can span from early childhood to adult life [1,2].

This contribution based on the rational design of the transition state analog inhibitors of the GT's, representing donor UDP-GlcNAc [3], introduces the synthesis of four precursors, namely benzyl 2-thio- α -D-fructofuranoside 1-diethylphosphate (**1**), its β -anomer (**2**), and their ethyl 2-thio analogues (α -anomer **3** and β -anomer **4**).

Starting from benzyl or ethyl 2-thio- α - or β -D-fructofuranosides, respectively [4], sequential protection at position C-6 with *tert*-butyldimethylsilyl group, at C-1 with dimethoxytrityl group, at C-3 and C-4 with acetyl groups, followed by detritylation afforded nucleophiles having a free OH-group at C-1 [5]. These were coupled with diethyl chlorophosphosphate to give blocked D-fructofuranoside 1-diethylphosphates. The desired precursors **1-4** were finally obtained by usual detritylation and deacetylation.



Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References:

1. Montreuil J., Vliegenhart J.F.G., Schachter H., *Glycoproteins I*, **1995**, Vol. 29A, Amsterdam: Elsevier
2. Montreuil J., Vliegenhart J.F.G., Schachter H., *Glycoproteins and Diseases*, **1996**, Vol 30, Amst.: Elsevier
3. Raab M., Kozmon S., Tvaroška I., *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 1051
4. Krog-Jensen C., Oscarson S., *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 1234
5. Hirsch J., Koóš M., Tvaroška I., *Chem. Papers*, **2009**, 63, 329

SYNTHESIS OF SOME PRECURSORS OF GLYCOSYLYLTRANSFERASE INHIBITORS

Marek Baráth , Igor Tvaroška, Miroslav Koóš and Ján Hirsch

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

Glycosyltransferases are enzymes that catalyst transfer of monosacharidic unit from an activated sugar phosphate to an acceptor molecule, usually an alcohol. The result of glycosyl transfer can be a monosaccharide glycoside, an oligosaccharide or polysaccharide.

During oligosaccharide processing, oligosaccharides are converted into hybrid and complex oligosaccharides by the addition of *N*-acetylglucosaminyl (GlcNAc) residues. This transfer is catalysed by *N*-acetylglucosaminyltransferases (GlcNAc-T's). In such a transfer, the donor of the GlcNAc residue is UDP-GlcNAc while the acceptor is one of the hydroxyl groups located at a particular position of a variety of oligosaccharides.¹

Different strategies have been used in order to identify potent inhibitors of glycosyltransferases. The main goal of this project is to design of the transition state (TS) analogs starting from the donor UDP-GlcNAc. A leading idea of all these TS analogs is a „1-thio“ linker between a mimetic of GlcNAc in TS geometry and a mimetic of the acceptor bearing the β -D-psicofuranose backbone with key substituion on postion C-1 by the phosphate group and on position C-2 by the thiophenyl group.

We report here a synthesis of some precursors of glycosyltransferase inhibitors, bearing D-fructo, D-psico and D-tagato-furanose ring. The synthesis starts from corresponding tetrabenzoylated derivative to produce fructofuranose-based inhibitors and from diisopropylidene derivatives to give psico and tagato-based mimetics.² The multiple synthesis using standard protective and deprotective procedure gave in all cases precursors, ready to be used for the key step of synthesis - phosphorylation in position C-1.

A multi-members library of similar compounds can be reached by usage of similar synthetic strategy. These compounds will undergo a biological assays on human GnT's, namely (GnT-I, Core2GnT and GnT-V).

Acknowledgements: This work is supported by the grants: VEGA No:2/0101/11, VEGA No:1/0962/12, Centre of Excellence-GLYCOMED and Centre of Excellence for Glycomics ITMS 2624012003, supported by the Research &Development Operational Programme funded by the ERDF.

References:

- (1) Schachter, H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 755-765, **1991**.
- (2) Mio, S.; Kumagawa, Y.; Sugai, S. 47, 2133-2144, *Tetrahedron* **1991**.

FTIR AND NMR SPECTROSCOPIC STUDY OF MODIFIED PECTINS

Anna Malovíková¹, Vlasta Sasinková¹, Iva Sroková², Lydia Rychlá³, Ivica Janigová³, Katarína Csomorová³, Ján Hirsch¹, Anna Ebringerová¹

¹Institute of Chemistry ,Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dubravsku cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

²Faculty of Industrial Technologies, Trenčín University of A. Dubček, Trenčín, Slovakia

³Polymer Institute, Slovak Academy of Sciences, 845 41 Bratislava, Slovakia

E-mail: chemhirs@savba.sk

Pectins are widely used as gelling and thickening agents in food industry and are known as valuable dietary fiber components [1]. Pectins can be structurally modified to alter their physicochemical properties so that their functional properties can be improved as well as novel ones achieved. In this way, they have gained a large impact in pharmacy and medicine [2,3]. Besides the types of substitution, the degree of substitution (DS) affects properties of the derivatives. DS is normally determined by wet chemistry methods which are destructive to the samples, time-consuming and may involve the use of harmful chemical reagents. As alternatives, vibrational and NMR spectroscopy are becoming more and more reliable and affordable candidates.

In this study, Fourier transform infrared (FTIR) and ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy techniques were used to analyze a set of chemically modified derivatives prepared from citrus pectin by the controlled de-esterification of commercial methyl esterified pectin, acetylation, amidation and alkylamidation. Distinct vibrations and corresponding chemical shifts of functional groups in FTIR spectra and NMR spectra, respectively, were used to determine the structural changes introduced by the different modifications. For comparison, the DS of the derivatives was determined by chemical methods (alkalimetry, elemental analysis). The functional properties of the pectin derivatives were studied in view of the emulsifying capability and thermal and thermooxidative stability, which both are important for characterizing pectin additives in food, cosmetics and pharmacy. The results will also aid their future applications in the characterization of pectic polysaccharides from novel plant sources and/or identification of various pectin additives in food products.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

1. Willats, W. G. T., Knox, P., Mikkelsen, J. D. *Trends Food Sci. Technol.*, **2006**, 17, 97–104.
2. Yang, S., Cheng, K., Lin, Y., Liu, Y., Hou, W. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 4270-4273.
3. Sørensen, I., Pedersen, H. L., Willats, W. G. T. *Carbohydr. Res.*, **2009**, 344, 1872-1878.

Synthesis of *p*-nitrophenyl β -D-glycosides of disaccharide of homoxylan type and trisaccharide of 4-O-methyl-glucuronoxylan type

Ján Hirsch, Marek Baráth, Miroslav Koóš and Peter Biely

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

Synthesis of oligosaccharides related to hemicelluloses of xylan type has been developed mainly for characterization of the structural features, physicochemical and various functional properties of these natural polysaccharides.

This contribution describes the synthesis of two model di- and trisaccharides of xylan type, namely *p*-nitrophenyl 4-*O*-(2-*O*-benzyl- β -D-xylopyranosyl)- β -D-xylopyranoside (1) and *p*-nitrophenyl 4-*O*-[2-*O*-(methyl 4-*O*-methyl- α -D-glucopyranosyluronate)- β -D-xylopyranosyl]- β -D-xylopyranoside (2) in order to serve as the chromogenetic substrates for testing of xylanase belongs to the GH5 family.

The starting point in the synthesis of disaccharide 1 was nucleophile *p*-nitrophenyl 2,3-di-*O*-benzoyl- β -D-xylopyranoside [1] which was coupled with 3,4-di-*O*-acetyl-2-*O*-benzyl- α , β -D-xylopyranosyl acetimidate (prepared from 1,3,4-tri-*O*-acetyl-2-*O*-benzyl-D-xylopyranose [2]). The final disaccharide 1 was obtained by deacylation of the isolated blocked disaccharide from the reaction mixture in a good yield. For preparation of model trisaccharide 2, related to 4-O-methylglucuronoxylan, the 3,4-di-*O*-acetyl-2-*O*-(methyl 2,3-di-*O*-acetyl-4-*O*-methyl- α -D-glucopyranosyluronate)- α , β -D-xylopyranosyl acetimidate [3] was used as a glycosylating agent in a coupling reaction with *p*-nitrophenyl 2,3-di-*O*-benzoyl- β -D-xylopyranoside. The protected trisaccharide isolated by chromatography after deacylation gave aimed 2 in a satisfactory yield. The structure of both model oligosaccharides 1 and 2 and also their precursors was confirmed by NMR spectroscopy.

References:

- [1] Takeo, K.; Ohguchi, Y.; Hasegawa, R.; Kitamura, S.: *Carbohydr. Res.* 1995, 277, 231
- [2] Kováč, P.; Palovčík, R.: *Chem. Zvesti* 1977, 31, 98
- [3] Hirsch, J.; Koóš, M.; Kováč, P.: *Carbohydr. Res.* 1998, 310, 145

Acknowledgments:

This work was supported by the grants VEGA No. 2/0101/11 and 1/0962/12; Centre of Excellence-GLYCOMED and Centre of Excellence for Glycomics ITMS 26240120031, supported by the Research&Development Operational Programme funded by the ERDF

Honeys vary in the content of honeybee antibacterial peptide defensin1

Juraj Majtán^{a,c}, Jaroslav Klaudiny^b, Jana Bohová^b, Mária Bartošová^d, Viktor Majtán^c

^aInstitute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia

^bInstitute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

^cDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Slovak Medical University, Limbova 12, 833 03, Bratislava, Slovakia

^dFaculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia

Introduction

Honey possesses antimicrobial properties that are employed at treatment of cold, throat ache and influenza, as well as in the treatment of infected wounds in folk and clinical medicine. Major antibacterial factors in honey are low pH, high osmolarity, hydrogen peroxide and the antibacterial peptide defensin1 (1). Defensin1 is a 51 amino acids-long cationic peptide effective against Gram-positive bacteria (2, 3). It seems to be constitutively expressed in cephalic hypopharyngeal and mandibular glands of nurses (4, 5), a generation of honeybees aged between 5-15 days that produce larval jelly- specific food for the brood. Very recently, its expression was also reported in the heads of older honeybees: foragers that collect pollen (6).

The aim of this work was to evaluate the content and antibacterial activity of bee defensin1 in honey samples of different botanical origins.

Materials and Methods

Honey samples were obtained from several regions in Slovakia (Table 1). Commercially available manuka honey (UMF 15+), imported from New Zealand, was purchased from Nature's Nectar (Surrey, UK).

Preparation of honey extracts

Honey sample (2.5 g) was dissolved in deionized water to a final volume of 5 ml. The liquid solution obtained was filtered through a 0.22 µm PES filter (Millipore, MA, USA) and then concentrated by centrifugation at 5000 × g at room temperature in a Vivaspin 6 concentrator tube (Sartorius, Germany), with an exclusion limit of 5 kDa, to a final volume of 500 µl. The Vivaspin retentate was subsequently washed with 5 ml of deionized water and concentrated again in a Vivaspin 500 concentrator tube (exclusion limit 5 kDa) to a final volume of 100 µl.

Analysis of defensin1 content in honey extracts

The retentates of the honey samples were electrophoresed on 16,5% Tricine-SDS-PAGE gel (7) using a Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad, CA, USA). The proteins were transferred onto a 0.1 µm nitrocellulose Whatman® Protran® membrane (Sigma-Aldrich, UK) in 48 mM Tris, 39 mM glycine and 20% methanol using the semi-dry blotting procedure. The membrane was blocked for 1 h in a TBST buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.05% Tween 20) containing 1% BSA (TBST-B buffer) and then incubated overnight with a purified rabbit polyclonal antibody against recombinant honeybee defensin1 (Klaudiny et al., 2012) diluted 1:140 in TBST-B. After washing with TBST, the membrane was incubated for

2 h in TBST-B buffer containing swine anti-rabbit HRP-linked antibodies (Promega, WI, USA) diluted 1:2500. Immunoreactive bands were detected in solution containing dissolved SigmaFast 3,3-diaminobenzidine tablets (Sigma-Aldrich, UK) and 0.03 mM NiCl₂.

Determination of antibacterial activity of defensin1 in honey extracts

Antibacterial efficacy of extracts was evaluated by the radial diffusion assay. *Micrococcus luteus* as a model Gram-positive bacterium, was suspended in 8 ml of 0.7 % (w/v) agar in LB broth (at 48 °C) at 10⁶ CFU/ml and poured into 90 mm Petri dishes. After solidification, 2 mm-diameter wells were punched into the agar and a 4 µl sample was added to each well. The antibacterial activity of the samples was compared on the basis of the radius of a clear inhibition zone around the wells after 18 h of incubation at 30 °C. The results are shown as mean values from triplicate measurements.

Table 1. Examined honeys

Honey sample	Principal botanical origin	Sample age (year)	Geographic origin in Slovakia
hawthorn	<i>Crataegus laevigata</i>	1	Myjava
sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	1	Bellova Ves
honeydew 1	<i>Abies alba</i> Mill	2	Banská Štiavnica
honeydew 2	<i>Abies alba</i> Mill	2	Bardejov
honeydew 3	<i>Abies alba</i> Mill	1	Stará Voda
acacia 1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	1	Myjava
acacia 2	<i>Robinia pseudoacacia</i>	1	Šahy

Results and discussion

The content and activity of defensin1 were examined in honey extracts- ultrafiltration retentates (>5 kDa) of honeys in which only substances with higher molecular weight (MW) than 5 kDa including defensin1 should be present. By this way, low MW antibacterial compounds of honeys were excluded from analyses. The retentates of the eight honey types analysed, with various botanical and geographical origins, showed different levels of antibacterial activity in the diffusion assay, as well as the differences in defensin1 contents. No antibacterial activity was observed in the retentate of manuka honey. The highest antibacterial activity exhibited the retentate of hawthorn honey (Fig. 1A).

Bands of defensin1 with sizes of around 5.5 kDa were detected on the immunoblots using an anti-defensin1 antibody for all honey samples except manuka honey. Manuka honey yielded a protracted immunoreactive defensin1 band with a higher MW ranging from 20 to 25 kDa (Fig. 1B).

The intensity of defensin1 bands and the antibacterial activities showed partial correlations in most retentates of the honey types, except for the inactive manuka honey. The intensity of defensin1 did not correspond well with the activity determined in sunflower and honeydew3 honeys. The reason(s) of the observed discrepancies are unknown in the case of

last two mentioned honeys and they could include an influence of some environmental, compositional and storage factors on the defensin1 activity. Differences in the contents of defensin1 were also observed among honey samples of the same botanical but different geographical origins (acacia and honeydew *Abies alba* Mill honeys).

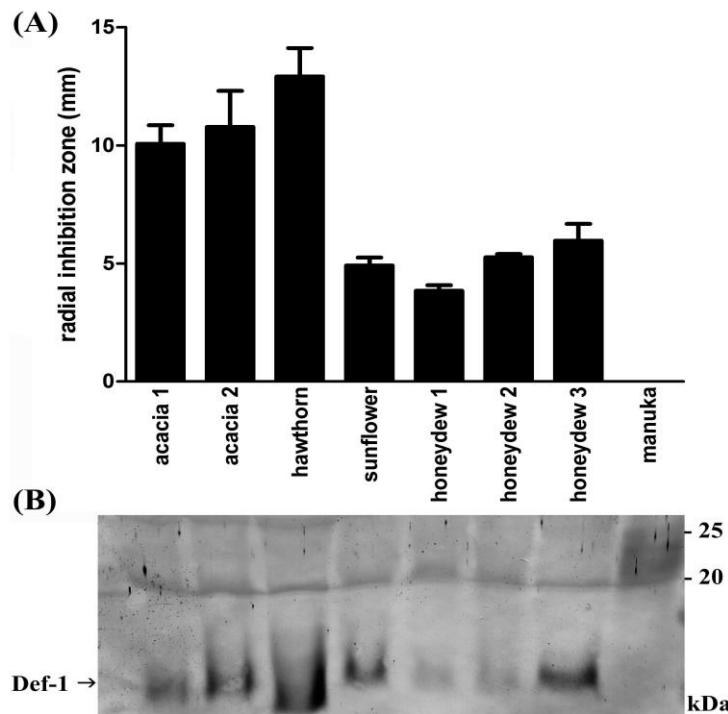


Figure 1. Antibacterial activity and content of bee defensin1 in examined honey samples.

(A) Antibacterial activity of 50% (w/v) water solutions of the honey samples after their concentration in the ultrafiltration column (5 kDa MWCO) was determined by a radial diffusion assay using *M. luteus*. (B) Defensin1 was detected by immunoblotting using a polyclonal antibody against honeybee defensin1. Five and ten microlitre retentates equivalent to 125 and 250 mg of undiluted honey were used for the antibacterial diffusion

Obtained data document that defensin1 is a regular but quantitatively variable component of honeys. It seems that amount of defensin1 in honey depends on the defensin1 production capacity of honeybees in colonies which participate on preparation of honey samples. Missing antibacterial activity and higher MW of defensin1 in manuka honey result from the modification of the peptide by reactive methylglyoxal (see the other contribution to this conference). Observed variation in defensin1 content in honeys indicates possible differences in a medicinal potency of various honey samples what requires further research.

Acknowledgements

We thank Dr. Ján Kopernický, Mr. Jozef Volanský and Mr. Alexander Kiss for providing honey samples. This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

- [1] Kwakman, P.H., Te Velde, A.A., De Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Zaai, S.A. 2011. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. PLoS ONE 6, e17709.

- [2] Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.* 265, 11333-11337.
- [3] Bachanova, K., Klaudiny, J., Kopernicky, J., Simuth, J. 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33, 259-269.
- [4] Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanova, K., Kopernicky, J., Šimúth, J. 2005. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 11-22.
- [5] Klaudiny, J., Bachanova, K., Kohutova, L., Dzurova, M., Kopernicky, J., Majtan, J. 2012. Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies, *Biologia (Bratisl.)* 67, 200-211.
- [6] Liu, F., Li, W., Li, Z., Zhang, S., Chen, S., Su, S. 2011. High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *J. Insect Physiol.* 57, 274-279.
- [7] Schägger, H., von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166, 368-379.



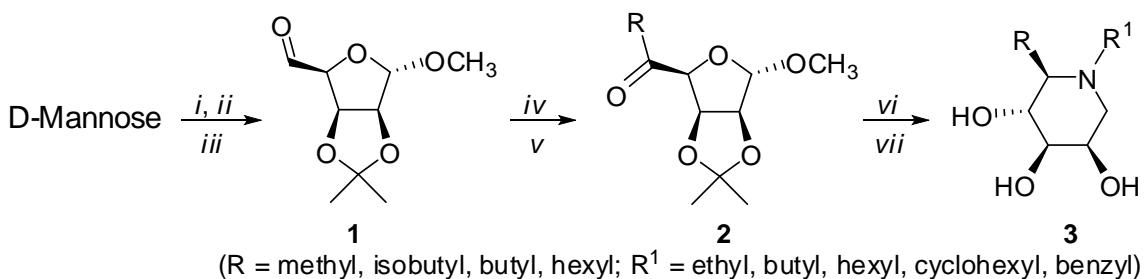
Stepwise synthesis and characterization of *N*-alkylsubstituted analogues of 1,6-dideoxymannojirimycin

Bohumil Steiner, Maroš Bella, Miroslav Koóš

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Centre of Excellence GLYCOMED,
Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

E-mail: chemmiro@savba.sk

It is well known that 1-deoxymannojirimycin (1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol) is powerful inhibitor of mannosidase, an enzyme which is considerably widespread in living organisms. It inhibits Golgi α -mannosidase I but not endoplasmic reticulum (ER) α -mannosidase. Both *N*- and *O*-substitution of 1,5-dideoxy-1,5-iminoalditols and 1,4-dideoxy-1,4-iminoalditols as well as modification on carbon atoms significantly modulates their inhibition potency against enzymes catalyzing sugar transformations [1]. In our previous studies, we have prepared some precursors of mannojirimycin analogues *via* Bucherer–Bergs reaction of the ketone **2** ($R = \text{Me}$, isobutyl) [2–4].

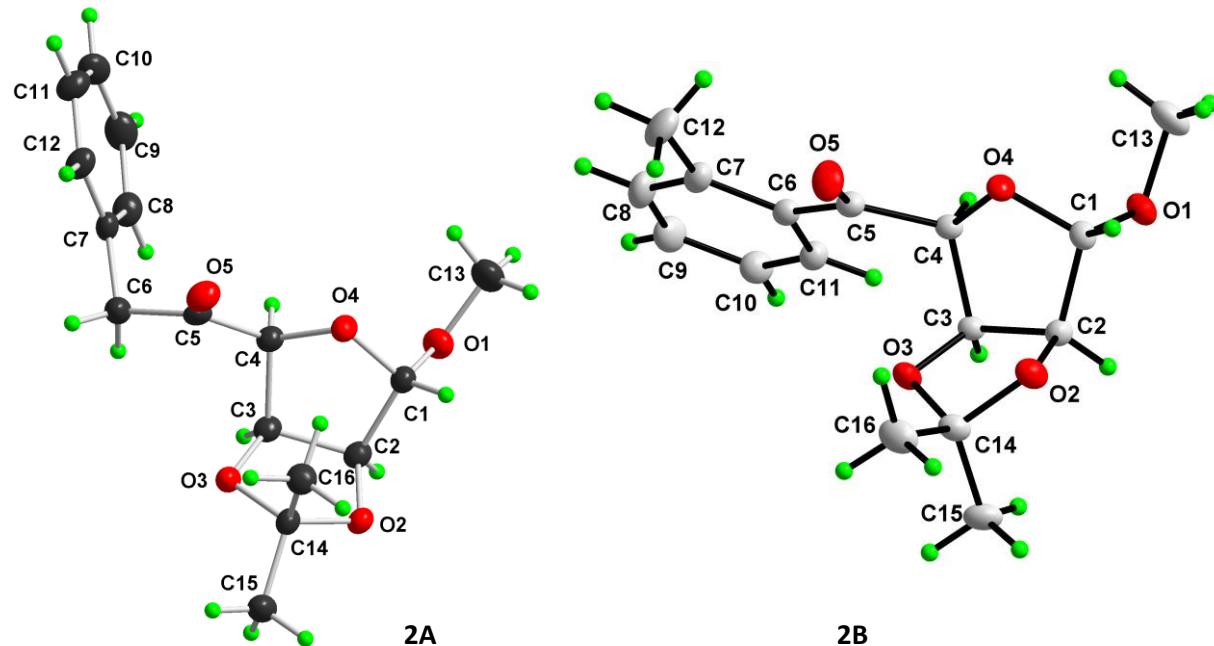


Reaction conditions: *i*) Me_2CO , MeOH , HCl ; *ii*) 70% AcOH ; *iii*) NaIO_4 , MeOH ; *iv*) RMgI or RMgBr or RMgCl , Et_2O or THF ; *v*) PDC, CH_2Cl_2 ; *vi*) aq. HCl , MeOH , H_2O ; *vii*) R^1NH_2 , NaCNBH_3 , MeOH .

Starting from D-mannose, aldehyde **1** (having suitably protected all hydroxyl groups) was prepared in three steps by the known procedure (simultaneous 2,3:5,6-di-*O*-isopropylidenation and methyl glycosylation, followed by the selective 5,6-*O*-deisopropylidenation and periodate oxidation). Subsequent Grignard reaction of **1** and oxidation of the obtained mixture of epimeric alcohols gave the ketone **2**. In the next steps,

the protecting groups were removed under acidic conditions, followed by the double reductive amination to afford deoxymannojirimycin analogues **3**. Reductive amination was unsuccessful when R in **2** represented benzyl or *o*-tolyl.

The structure of all new compounds was determined on the basis of spectral (¹H and ¹³C NMR, EI-MS, FTIR) data as well as data of elemental analyses. In addition, the structure of ketones **2** (**2A**, R = benzyl; **2B**, R = *o*-tolyl) was unambiguously established using the single-crystal X-ray analysis.



Acknowledgements.

Financial support of this work by the Slovak Research and Development Agency (Grant No. APVV-0366-07) and by the Scientific Grant Agency (Grant VEGA Nos. 2/0199/09 and 2/0101/11) is gratefully appreciated. This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

1. H. Paulsen, M. Matzke, B. Orthen, R. Nuck, and W. Reutter, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 953–963.
2. B. Steiner, J. Mičová, M. Koóš, V. Langer, and D. Gyepesová, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 1349–1357.
3. J. Mičová, B. Steiner, M. Koóš, V. Langer, and D. Gyepesová, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 1917–1924.
4. J. Mičová, B. Steiner, M. Koóš, V. Langer, and D. Gyepesová, *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 2187–2195.

Effect of honey in wound healing process through activation of human keratinocytes

Juraj Majtan¹, Pawan Kumar², Andrew Walls³ and Jaroslav Klaudiny⁴

¹Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia

²Laboratory of Molecular Immunology, Blood Research Institute, Milwaukee, WI 53226, USA

³Immunopharmacology Group, Southampton General Hospital, Southampton, SO16 6YD, UK

⁴Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

Introduction

Historically, honey has been used in a treatment of the broad spectrum of injuries, including wounds, burns and ulcers. Honey offers broad-spectrum antimicrobial properties and it promotes rapid wound healing [1]. It has been assumed that the antibacterial action of honey has its main impact on the healing process of chronic wounds and burns.

Since the direct antimicrobial effects of honey were fully characterized *in vitro*, research has focused on identifying the substances responsible for its immunomodulatory effects [2, 3]. Epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts are key cellular skin components of the wound healing cascade and repair process. Alongside macrophages, keratinocytes indisputably play a central role in the production of many of the pro-inflammatory cytokines [4, 5] that have an important part in the first phase of the wound healing process. Up until now, there have been very few studies investigating the effect of honey on keratinocytes or cell types other than monocytes and macrophages. The aim of this study was to investigate the effect of natural honey on MMP-9 and cytokines production from human epidermal keratinocytes.

Materials and Methods

Honey

The desired amount of acacia honey was weight and diluted in PBS. The honey solution were made up to 50% (w/v) and rendered sterile by filtration through 0.22 µm PES filter. All experiments were conducted on 1% honey solutions.

Isolation of keratinocytes

Skin tissue was cut into small pieces and incubated with 2 U/ml of dispase (Invitrogen, UK) at 4 °C overnight. The epidermis was separated from the dermis with fine forceps and placed in 3 ml of 0.05% trypsin/0.02% EDTA solution for 15 min. An equal volume of soybean trypsin inhibitor (0.25 mg/ml, Sigma-Aldrich, UK) was employed to stop the reaction of trypsin. The cells were passed through 100 µm sterile gauze, washed and cultured in serum free keratinocyte specific growth medium (Invitrogen, UK) according to manufacturer's instruction.

Real-time PCR

Total RNA was extracted using RNAeasy Mini kit (Qiagen, UK) from keratinocytes lysed by Qiagen lysis buffer, and cDNA was obtained by reverse transcription (Primer Design, UK). Approximately 10 ng of cDNA was used per reaction to amplify TNF-α, IL-1β, TGF-β and 28S rRNA transcripts using a SYBR-Green PCR assay mastermix and primer sets designed by Primer Design (Primer Design, UK). Amplifications were performed in duplicate on an

iCycler real-time detection system (Bio-Rad, UK) using the following conditions: 95 °C for 10 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds and annealing/extension at 60 °C for 1 min. Resulting CT values with the various stimuli were normalized to 28S rRNA and expressed as relative units (RU) above the vehicle treated samples.

Results and Discussion

The beneficial effects of honey have been documented not only in humans, but also in animal models [1]. Honey stimulates the rate of angiogenesis, granulation and epithelialization in animals [6, 7].

In this study, acacia honey promoted an up-regulation of mRNA expression for IL-1 β and TGF- β by twelvefold and eightfold, respectively (Fig. 1b,c). On the other hand, mRNA expression of TNF- α after incubation of keratinocytes with honey was just twofold up-regulated (Fig. 1a). In addition, honey significantly enhances the mRNA expression of MMP-9 in primary keratinocytes (Fig. 1d).

Our results document that honey activates human keratinocytes what is associated with up-regulation of expression of certain cytokines (TNF- α , IL-1 β and TGF- β) and MMP-9. Further studies are needed to reveal another factors and molecular mechanisms participating at keratinocytes activation by honey.

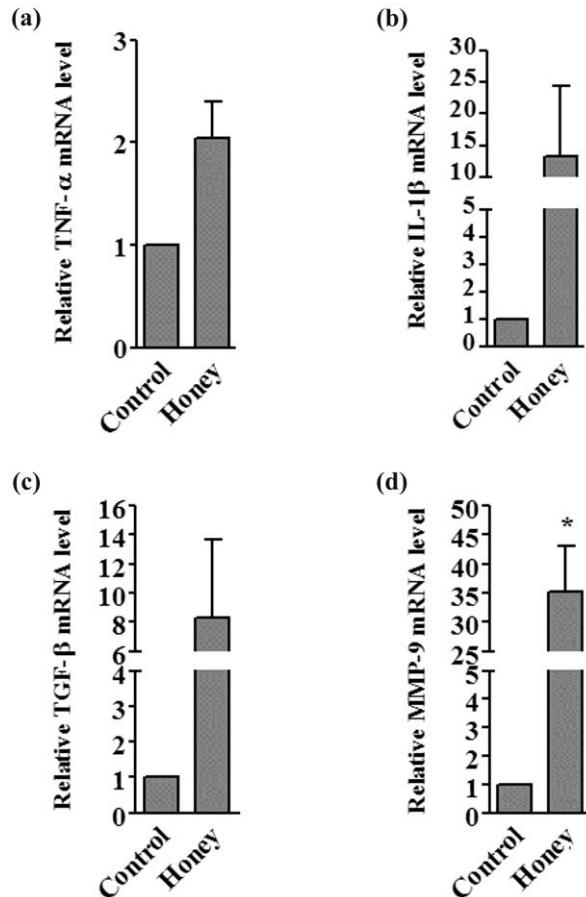


Fig. 1

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

- [1] P.C. Molan, The evidence supporting the use of honey as a wound dressing, *Int J Low Extrem Wounds.* 5 (2006) 40-54.
- [2] M. Fukuda, K. Kobayashi, Y. Hirono, M. Miyagawa, T. Ishida, E.C. Ejiofor, et al., Jungle Honey Enhances Immune Function and Antitumor Activity, *eCAM.* 2011 (2011) Article ID 908743.
- [3] J. Majtan, P. Kumar, T. Majtan, A.F. Walls, J. Klaudiny, Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 19 (2010) e73-e79.
- [4] A. Oxholm, M. Diamant, P. Oxholm, K. Bendtzen, Interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha are expressed by keratinocytes but not by Langerhans cells, *APMIS.* 99 (1991) 58-64.
- [5] I.A. McKay, I.M. Leigh, Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing, *Br J Dermatol.* 124 (1991) 513-518.
- [6] S. Gupta, H. Singh, A. Varshney, P. Prakash, Therapeutic efficacy of honey in infected wounds in buffaloes, *Indian J Anim Res.* 62 (1992) 521-523.
- [7] A. Bergman, J. Yanai, J. Weiss, D. Bell, M.P. David, Acceleration of wound healing by topical application of honey. An animal model, *Am J Surg.* 145 (1983) 374-376.

Biotransformation of methanol formaldehyde by bacteria isolated from clouds.

S. Husárova^c, M. Sancelme^{a,b}, M. Matulová^c and A.-M. Delort^{a,b}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ^b CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 Aubière, France; ^c Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

A predominant catalyst for chemical reactions occurring in the atmosphere is represented by solar light. It is generally admitted that in the atmospheric aqueous phase of clouds the reactivity of organic compounds is driven by the presence of free radicals ($\cdot\text{OH}$, $\text{NO}_3\cdot$) mainly produced by photochemical processes. However, Amato et al. 2007 and Vaitilingom et al. 2010 have recently shown that living and active microorganisms are present in the atmospheric water and could play an active role in cloud chemistry.

Living microorganisms are biocatalysts which could transform organic compounds and a biodegradation could thus represent an alternative route to photochemistry in the cloud chemistry. The organic compounds present in cloud water such as alcohols, aldehydes and carboxylic acids are common intermediates of radical chemistry and microbial central metabolism (Figure 1).

The objective of our project is to study the degradation of methanol and formaldehyde, two important atmospheric pollutants by bacteria isolated from clouds. Long term goal of this study is to assess the role of microorganisms in atmospheric chemistry of methanol and formaldehyde.

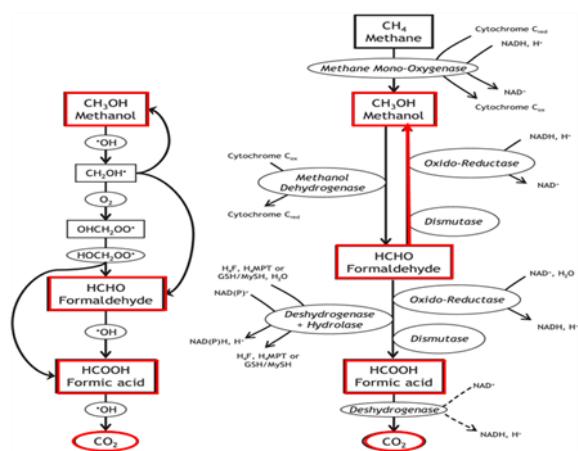


Fig. 1 Similarities between methanol degradation by microorganisms and by photochemistry.

Evolution of concentrations due to methanol and formaldehyde in presence of bacterial cells were observed by ^1H NMR or ^{13}C NMR spectroscopy. The biodegradation rates of methanol and formaldehyde measured from NMR experiments at both 5 °C and 17 °C by the four bacterial strains (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas graminis*, *Frigoribacterium* sp., *Bacillus* sp.) are reported in Table 1. They are expressed as mole of compound degraded per cell and per second.

Biotransformation of methanol

At 17 °C, all strains degraded methanol, at rates ranging from 10^{-21} to 10^{-23} mol cell $^{-1}$ s $^{-1}$. At 5 °C, the rates of methanol transformation were lower and could be only measured for two strains, *P. syringae* and *Frigoribacterium* sp.

Considering the metabolic pathways involved in the transformation of C1 compounds, no intermediate was detected, suggesting that methanol was directly oxidized into formaldehyde, then formate and CO₂ as described in Figure 1.

Table 1 Biodegradation rates of methanol and formaldehyde

Compound	Methanol		Formaldehyde	
	Biodegradation rate (mol cell $^{-1}$ s $^{-1}$)			
Strain and temperature	5°C	17°C	5°C	17°C
<i>Pseudomonas graminis</i>	0	5.6×10^{-22}	8.1×10^{-21}	1.9×10^{-20}
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.8×10^{-22}	5.7×10^{-21}	8.6×10^{-20}	1.4×10^{-19}
<i>Frigoribacterium</i> sp.	2.5×10^{-23}	3.5×10^{-23}	6.4×10^{-21}	6.4×10^{-21}
<i>Bacillus</i> sp.	0	2.9×10^{-21}	3.1×10^{-21}	2.0×10^{-20}
Average	1.5×10^{-22}	2.3×10^{-21}	2.6×10^{-20}	4.6×10^{-20}

Biotransformation of formaldehyde

Formaldehyde was efficiently degraded by all four studied bacterial strains with values ranging between 10^{-19} - 10^{-21} mol cell $^{-1}$ s $^{-1}$ at both temperatures 17 °C and 5 °C. Thus, contrarily to methanol, low temperature was not a limiting factor for formaldehyde bacterial degradation.

Metabolite productions were observed during the biotransformation of formaldehyde (see **Figure 3**) such as methanol, formate and CO₂ (presence of HCO₃). Other metabolic intermediates were identified (see **Figure 4**), with notably production of C3 compounds (glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol) from formaldehyde by the strain *Bacillus* sp. This fact indicates its biotransformation via Serine cycle.

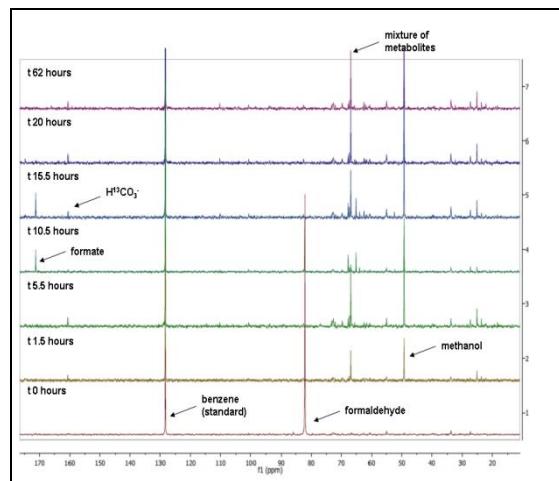


Figure 3 In vivo ^{13}C NMR experiment: Biodegradation incubation mix-

of ^{13}C -labelled formaldehyde by *Bacillus* sp. 3B6. biotransformation via Serine cycle.

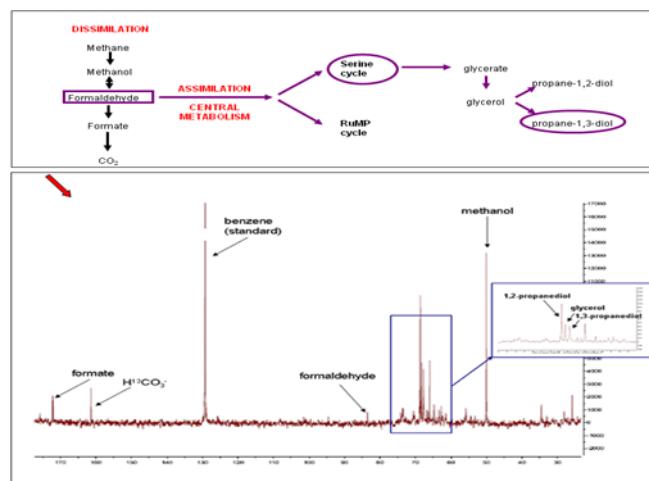


Figure 4 Identification of 1,3-propanediol in the

ture after 5.5h suggests its

References : S. Husárova et al. *Atmosph. Environ.* 45, (2011) 6093-6102.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Biotransformation and radical chemistry contribution in the methanol and formaldehyde degradation.

M. Vaïtilingom ^{a,c}, S. Husárova ^{a,e}, L. Deguillaume ^{c,d}, M. Traikia ^{a,b}, V. Vinatier ^{a,b}, M. Sancelme ^{a,b}, P. Amato ^{a,b}, M. Matulovà ^e and A.-M. Delort ^{a,b}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ^b CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 Aubière, France; ^c Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC/Laboratoire de Météorologie Physique LaMP, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^d CNRS, UMR 6016, LaMP, F-63177 Clermont-Ferrand, France

^e Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

Solar light is considered as the predominant catalyst for chemical reactions occurring in the atmosphere. It is generally admitted that in the atmospheric aqueous phase of clouds the reactivity of organic compounds is driven by the presence of free radicals ($\cdot\text{OH}$, $\text{NO}_3\cdot$) mainly produced by photochemical processes. Living microorganisms are biocatalysts which could transform organic compounds and a biodegradation could thus represent an alternative route to photochemistry in the cloud chemistry. The organic compounds present in cloud water such as alcohols, aldehydes and carboxylic acids are common intermediates of radical chemistry and microbial central metabolism.

We have shown that *Bacillus* sp. 3B6 efficiently degraded methanol and formaldehyde. In this study biodegradation kinetics of methanol and formaldehyde (two important pollutants of the atmosphere) by 4 bacterial strains (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp. and *Frigoribacterium* sp.) isolated from cloud water have been investigated by NMR at 5 °C and 17 °C. The biodegradation was observed at both temperatures with rates ranged from 10^{-19} to 10^{-21} mol cell⁻¹ s⁻¹ for formaldehyde, and from 10^{-21} to 10^{-23} mol cell⁻¹ s⁻¹ for methanol. C3 Compounds (glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol) were identified as metabolic intermediates from formaldehyde by *Bacillus* sp.

Extent of microbiological oxidation of organic compounds as an alternative route to radical chemistry in clouds was considered by comparison of biodegradation rates with those related to the reactivity of organic species with free radicals $\cdot\text{OH}$ (daytime chemistry) and $\text{NO}_3\cdot$ (nighttime chemistry). Our results show a clear evidence about the same range of magnitude of biological and chemical reaction rates and their relative contribution varied according tested scenarios, including the temperature of the clouds (5 or 17 °C), the category of the clouds (urban and remote) and the diurnal cycle (day and night time). They also show that biotransformation processes could be the main sink for C1 compounds in liquid clouds ($T \geq 5$ °C ≡ "warm cloud") during the night and both in polluted and non polluted clouds.

Protocol:

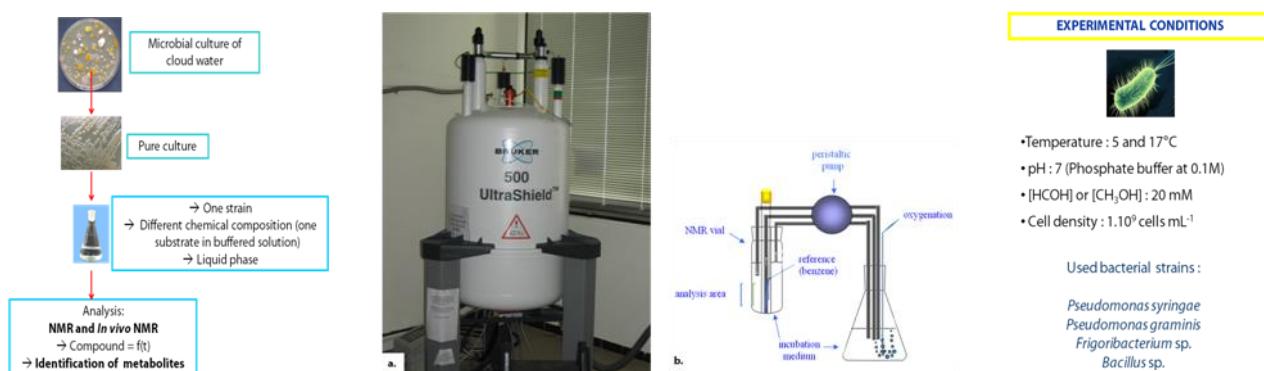


Figure 1 A – 500 MHz NMR spectrometer B – perfusion system

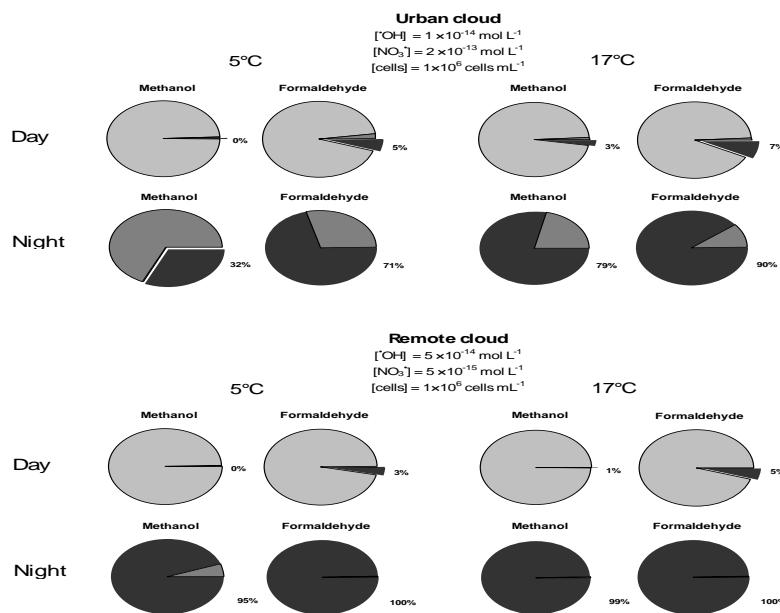


Figure 2 Comparison of radical chemistry and biodegradation of formaldehyde and methanol according tested scenarios, including the temperature of the clouds (5 or 17 °C), the category of the clouds (urban and remote) and the diurnal cycle (day and night time)

References :

1. P. Amato, M. Parazols, M. Sancelme, G. Mailhot, P. Laj, and A-M Delort. *Atmosph. Environ.* 41 (2007) 8253–8263.

2. M. Vařtilingom, P. Amato, M. Sancelme, P. Laj, M. Leriche and A.-M. Delort. *Appl. and Environ. Microbiol.* 79 (2010), 23-29.
3. S. Husárova, M. Vařtilingom, L. Deguillaume, M. Traikia, V. Vinatier, M. Sancelme, P. Amato, M. Matulova and A.-M. Delort. *Atmosph. Environ.* 45 (2011) 6093-6102.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Protónová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia ($^1\text{H-NMR}$) a dedičné metabolické poruchy

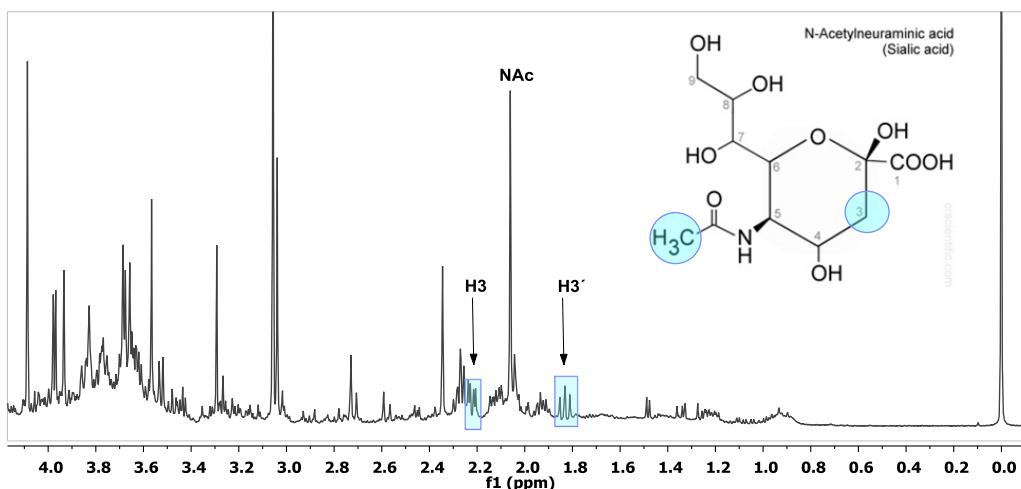
Šalingová A.¹, Behúlová D.¹, Matulová M.², Uhliariková I.², Kolníková M.³, Šaligová J.⁴, Potočňáková L.⁴

¹Centrum dedičných metabolických porúch Oddelenia laboratórnej medicíny, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou Bratislava, ²Centrum glykomiky, Chemický ústav SAV, Bratislava, ³Klinika detskej neurologie Detskej fakultnej nemocnice s poliklinikou Bratislava, ⁴Detská fakultná nemocnica Košice

Nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (NMRS) je v súčasnosti jednou z dôležitých kvantitatívnych, kvalitatívnych a zobrazovacích metód, ktorá v súčasnosti otvára nové perspektívy v diagnostike známych ale i neznámych dedičných metabolických ochorení. NMRS telových tekutín (sérum, plazma, moč, likvor) dokáže identifikovať väčšinu metabolitov obsahujúcich protón a vytvára tak charakteristický spektrálny obraz (fingerprint) v závislosti na aktuálnej koncentrácií metabolitov v zmesi.

Spolupráca Chemického ústavu SAV (vybaveného 600 MHz VNMRS Varian spektrometrom s triple HCN kryosondou so zvýšenou toleranciou na roztoky s vyšším obsahom solí) s Centrom dedičných metabolických porúch Oddelenia laboratórnej medicíny, DFN v Bratislave prispela k verifikácii a kvantifikácii viacerých metabolitov v moči. Skríningovou metódou (HPTLC) lekári zachytili v moči zvýšené vylučovanie guanidinoacetátu u 3 pacientov a voľnej kyseliny sialovej u 4 pacientov. Bolo potrebné verifikovať a kvantifikovať tieto klúčové metabolity, keďže kvalitatívna skríningová analýza je menej špecifická a zaťažená možnými interferenciami. V $^1\text{H-NMR}$ spektrách boli v príslušných vzorkách moču identifikované a kvantifikované signály zodpovedajúce jednak guanidinoacetátu ako aj kyseline sialovej.

$^1\text{H-NMR}$ spektroskopia je špeciálna analytická metóda zohrávajúca dôležitú úlohu v diagnostike niektorých dedičných metabolických ochorení, ktoré nemôžu byť zachytené v špecializovaných laboratóriach inými tradičnými technológiami. Metóda je nedeštruktívna, rýchla, nevyžaduje špeciálnu úpravu vzorky a možno ju považovať za alternatívny analytický postup. Optimálne výsledky $^1\text{H-NMR}$ analýzy telových tekutín si vyžadujú úzku spoluprácu medzi klinickým biochemikom, metabológom a špecialistom na NMRS analýzy.



Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

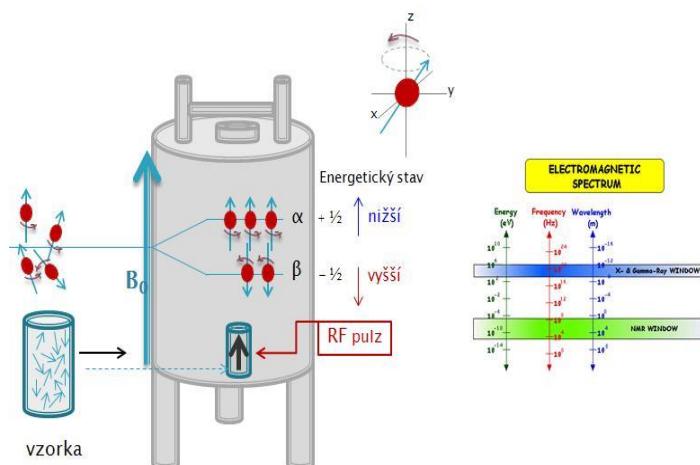
NMR spektroskopia a jej využitie v biochemickej diagnostike

M. Matulová¹, D. Behúlová², A. Šalingová², I. Uhliariková¹

¹Chemický ústav, Centrum glykomiky, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovensko

²Oddelenie laboratórnej medicíny, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

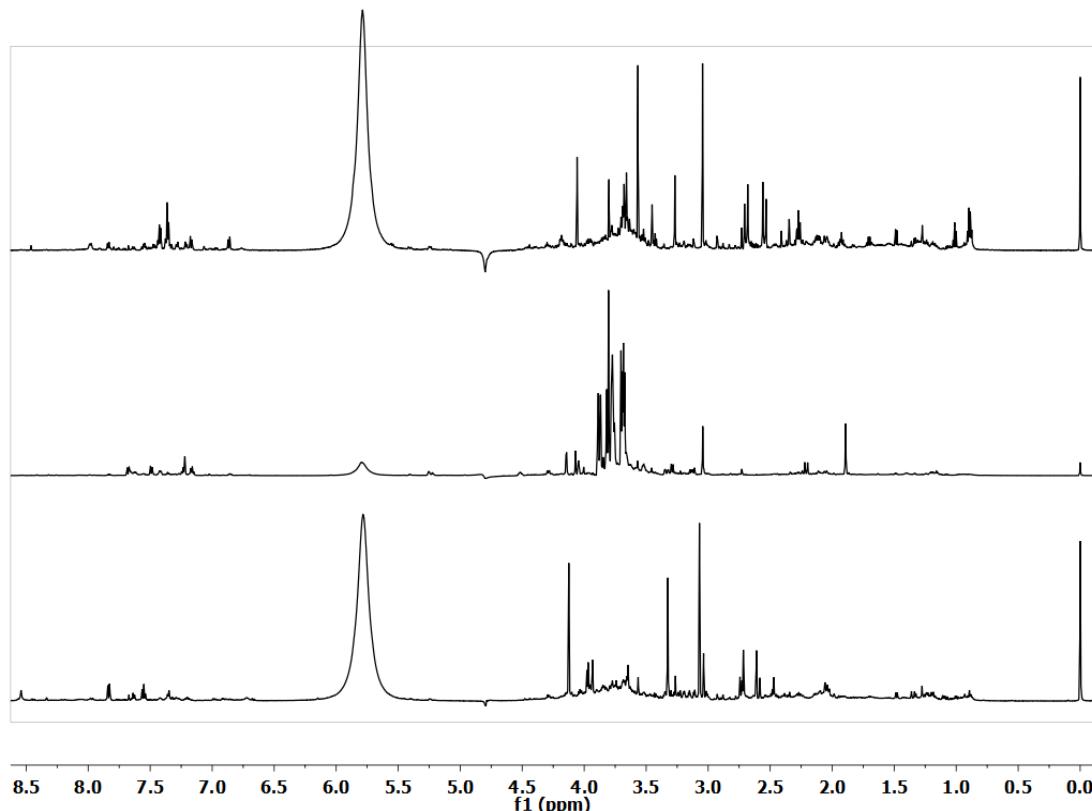
NMR spektroskopia využíva magnetické vlastnosti jadier. NMR spektroskopiou možno detegovať jadrá, ktoré majú nenulový magnetický spin (nepárny počet nukleónov) a teda nesú náboj. To spôsobuje, že rotáciou okolo vlastnej osi jadra vytvárajú okolo seba lokálne magnetické pole (magnetický moment). Orientácia magnetických momentov jadier v prostredí slabého zemského magnetického poľa, teda mimo magnetu spektrometra je náhodná. Po vložení vzorky do spektrometra však dochádza k ich zorientovaniu v smere a proti smeru magnetického poľa magnetu. NMR spektrum však vzniká až vyexcitovaním zorientovaných jadier z nižšej energetickej hladiny rádiofrekvenčným pulzom do vyššej energetickej hladiny. Aby došlo k excitácii jadra na vyššiu energetickú hladinu, energia RF pulzu musí zodpovedať rozdielu energií nižšej a vyššej energetickej hladiny pre dané jadro. Množstvo energie potrebnej na excitáciu je veľmi malé. Spadá do oblasti frekvenčného vysielania rozhlasu a televízie (KHz).



Z toho vyplýva, že NMR je energeticky najmiernejsia technika používananá v štrukturálnej analýze. Táto nedeštruktívna metóda je:

- rýchla (15 min) na získanie metabolickému profilu analýzou telových tekutín
- akýkoľvek metabolit obsahujúci protóny dáva v ^1H NMR spektre signály s charakteristickou polohou v spektri (chemický posun)
- kvantitatívna, teda intenzita signálu zodpovedá počtu protónov absorbijúcich energiu (rezonujúcich) s danou frekvenciou
- signály môžu byť naštiepené vplyvom susedných protónov na multiplety (interakčnou konštantou), môžu sa prekrývať

- vytvárajú spektrálny pattern (fingerprint) v závislosti na okamžitej koncentrácií metabolitov v zmesi (počet metabolitov môže byť väčší ako 1000)
- jej výhodou v diagnostike je aj to, že vzorky netreba špeciálne upravovať (derivatizovať)
- nevýhodou môže byť závislosť chemických posunov signálov (ich polohy v spektre) od pH



Obrázok 2 ^1H NMR spektrá vzoriek moču.

Záver:

^1H -NMR spektroskopia je špeciálna analytická metóda zohrávajúca dôležitú úlohu aj v diagnostike niektorých dedičných metabolických ochorení, ktoré nemôžu byť zachytené v špecializovaných laboratóriach inými tradičnými technológiami. Metóda je nedeštruktívna, rýchla, nevyžaduje špeciálnu úpravu vzorky a možno ju považovať za alternatívny analytický postup. Optimálne výsledky ^1H -NMR analýzy telových tekutín si vyžadujú úzku spoluprácu medzi klinickým biochemikom, metabológom a špecialistom na NMR analýzy.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Lenalidomid v liečbe myelodysplastického syndrómu

L. Messingerová¹, A. Jonášová², L. Gibalová¹, M. Barančík³, M. Šereš¹, Z. Sulová¹, A. Breier¹

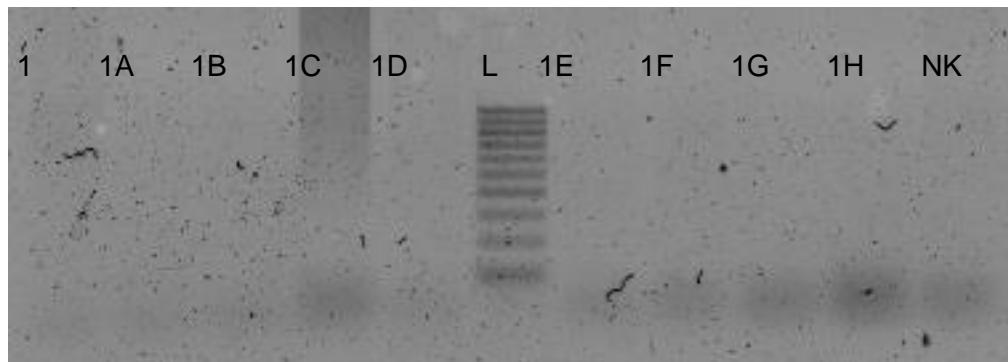
¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Bratislava, ²Hematologická ambulancia, I. Interná klinika, Všeobecná fakultná nemocnica Univerzita Karlova, Praha, ³Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava

Úvod: Myelodysplastický syndróm (MDS) je klonálna porucha charakterizovaná inefektívou hematopoézou, ktorá môže viest' na jednej strane k fatálnym cytopéniám a na druhej strane k rozvoju akútnej myeloidnej leukémie. MDS je v súčasnej dobe považovaný za hematologickú malignitu vychádzajúcu z pluripotentnej kmeňovej bunky. Heterogenita MDS spôsobuje, že priebeh tohto ochorenia sa u jednotlivých pacientov značne odlišuje. Z tohto dôvodu je ochorenie členené podľa staršej FAB (Francúzsko-Americko-Britská klasifikácia) a podľa novšej WHO (World Health Organization) klasifikácie do jednotlivých podskupín. V našom laboratóriu sa zaoberáme podskupinou pacientov s deléciou dlhého ramienka chromozómu 5 (5q- syndrómom). Tento syndróm bol prvý krát popísaný v roku 1974 Van den Bergom, patrí medzi najčastejšie chromozomálne abnormality a pacienti s týmto syndrómom majú dobrú prognózu. Medzi novšie prístupy v liečbe tohto ochorenia patrí aj lenalidomid, ktorý patrí medzi IMIDs (imunomodulačné liečivo) s antineoplastickými a antiangiogénymi účinkami. Má podobné biologické účinky ako talidomid ale menej nežiadúcich účinkov. Imunomodulačné účinky tohto lieku sú až 1000x silnejšie ako účinky talidomidu. Činnosť protinádorovej chemoterapie je však často výrazným spôsobom obmedzená vznikom rezistencie. Môže sa jednať o primárnu necitlivosť nádorových buniek k cytostatiku, avšak častejší je typ rezistencie, ktorý vzniká až v priebehu cytostatickej liečby, kedy sa pôvodne citlivá nádorová populácia stáva rezistentnou a účinnosť cytostatickej liečby sa znižuje. Multidrug rezistencia (MDR) je spôsobená zvýšenou expresiou minimálne dvoch génov a to MDR 1, ktorý kóduje transmembránový proteín P-glykoproteín (P-gp) a MRP1, ktorý kóduje "*multidrug associated protein*" (MRP). Enzýmy, ktoré majú významnú rolu v proliferácii a angiogénnych procesoch, sú matrixové metaloproteinázy (MMP). Zmeny v hladinách a aktivitách týchto enzýmov korelujú so zmenou citlivosti nádorových buniek na chemoterapiu a so vznikom multidrug rezistencie. MOLM bunková línia reprezentuje model akútnej myeloidnej leukémie odvodenej od myelodysplastického syndrómu. Použili sme túto bunkovú líniu na porovnanie efektu lenalidomidu a bežne používaných cytostatík vinkristínu a mitoxantrónu.

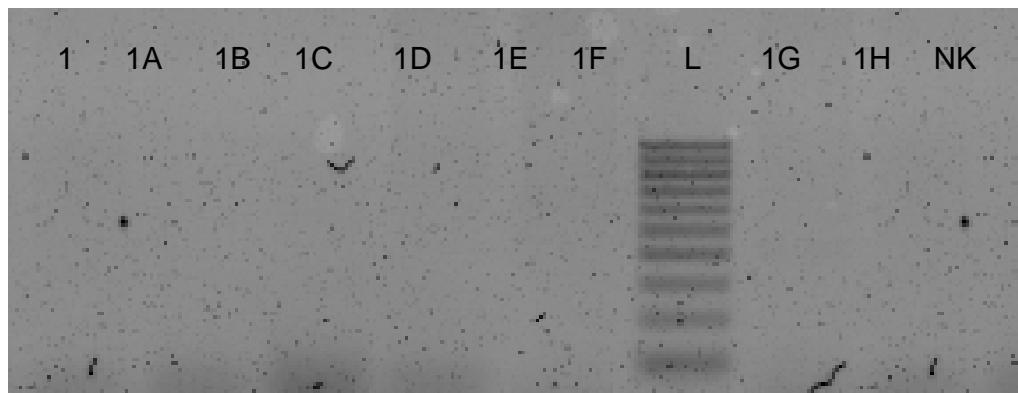
Materiál a metódy: Cieľom našej štúdie bolo sledovať efekt terapie lenalidomidom u pacientov s MDS na expresiu P-gp, MRP a sledovanie hladín a aktivít LDH (laktát dehydrogenáza) a MMP. Vzorky periférnej krvi a kostnej drene od pacientov s MDS 5q-liečených lenalidomidom boli spracované separáciou leukocytov na Ficoll a expresie P-gp a MRP boli stanovené pomocou RT-PCR. Aktivita MMP bola stanovovaná vo vzorkách plazmy pomocou zymografie. Hladiny MMP proteínov boli sledované pomocou Western blotu. Aktivita LDH bola stanovená ako NADH oxidácia spektrofotometricky podľa štandardného protokolu.

Výsledky a záver: Zistili sme, že liečba MDS pacientov lenalidomidom neindukovala zvýšenú expresiu P-gp a MRP mRNA. Na druhej strane liečba lenalidomidom vyvolala signifikantnú redukciu MMP aktivít v plazme. Predĺžovanie terapie s lenalidomidom vyvolalo signifikantnejšiu redukciu MMP a LDH aktivít rovnako ako redukciu hladín proteínov MMP v plazme pacientov. Doterajšie výsledky naznačujú, že liečba lenalidomidom u pacientov s myelodysplastickým syndrómom 5q- nespôsobuje zmeny v expresii P-gp a

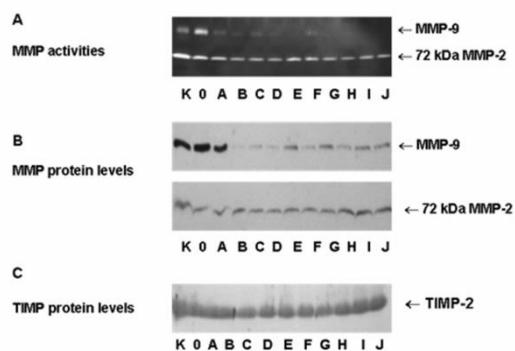
MRP. Taktiež sa zdá, že zmeny v hladinách a aktivitách MMP sa môžu podieľať na efektívnosti liečby lenalidomidom pri pacientoch s MDS.



Obr. 1. Sledovanie expresie MRP. 1-1H pacient s MDS počas liečby lenalidomidom, NK negativna kontrola, PK pozitívna kontrola, L ladder



Obr. 2. Sledovanie expresie Pgp. 1-1H pacient s MDS počas liečby lenalidomidom, NK negativna kontrola, PK pozitívna kontrola, L ladder



Obr. 3. Sledovanie zmien matrixových metaloproteináz. 0 pacient pred liečbou, A-J pacient počas liečby, K zdravá kontrola,

A-zmeny v aktivitách MMP

B-zmeny v hladinách proteínov MMP9 a MMP2.

C-Zmeny v hladinách proteínov TIMP-2

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Biorecognition of various types glucoamylases with Concanavalin A.

D. Mislovičová^a, J. Masárová^a, E. Hostinová^b, J. Gašperík^b, P. Gemeiner^a

^a Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

^b Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava, Slovakia

The topic of the present work was to modulate the ability of different types of glucoamylases, by using the native and the recombinant enzymes, for the interaction with Con A. It was also intended to prepare “tailor-made” neoglycoenzymes by chemical modification of nonglycosylated recombinant glucoamylase with mannan using the method for glycosylation described in our previous works [21,23]. The obtained results indicate how the differences in the structure of glucoamylases influence their interaction with Con A.

Various types of glucoamylases were prepared. Glucoamylase Glm was isolated from the native yeast strain *Saccharomyces fibuligera* IFO 0111. Two glycosylated recombinant glucoamylases Glu's of *S. fibuligera* HUT7212 were expressed and isolated from the strains *Saccharomyces cerevisiae* and one, nonglycosylated, from *Escherichia coli*. The biospecific affinity of those preparations to Concanavalin A was investigated and compared with the commercially available fungal glucoamylase GA from *Aspergillus niger*.

Table 1. Characterization of used glucoamylases

Glucoamylase	Mw (kDa)	Manner of glycosylation	Content of saccharide (%)
Glm	62	-N-	7.9
rGluS.c.A	64	-N-	18.4
rGluS.c.B	62	-N-	11.8
GA	97	-O-	12.8
rGluE.c.	55	Nonglycosylated	0

Three methods of characterization glucoamylases – Con A interaction were used: precipitation, inhibition methods and surface plasmon resonance. All glycosylated enzymes showed affinity to Concanavalin A characterized by their precipitation courses and by the equilibration dissociation constants within the range from 1.43 to 4.17×10^{-6} M (Table 2)

Table 2. Glucoamylases–Con A interaction determined by SPR method

Glucoamylase	k_a (1/M s) ^a	k_d (1/M) ^a	K_D (M)
Glm	$(5.01 \pm 0.11) \times 10^3$	$(2.09 \pm 0.11) \times 10^{-2}$	4.17×10^{-6}
rGluS.c.A	$(5.10 \pm 0.19) \times 10^3$	$(1.56 \pm 0.11) \times 10^{-2}$	3.05×10^{-6}
rGluS.c.B	$(8.33 \pm 0.34) \times 10^3$	$(2.74 \pm 0.12) \times 10^{-2}$	3.29×10^{-6}
GA	$(3.69 \pm 0.97) \times 10^4$	$(5.28 \pm 0.12) \times 10^{-2}$	1.43×10^{-6}

^aPresented values are averages of three measurements

The results suggested some differences in the interaction of Con A with the individual glucoamylases. The highest affinity to Con A showed GA. The recombinant glucoamylase

Glu with the higher content of the saccharides was comprised by two binding sites with the different affinity. The glucoamylases with the lowest affinity (Glm and Glu with a lower content of saccharides) also demonstrated a nonspecific interaction with Con A in the precipitation experiments. The minimal differences between the individual glucoamylases were determined by the inhibition experiments with methyl- α -d-mannopyranoside.

Keywords: Glucoamylase; Concanavalin A; Biospecific interaction; Precipitation; Inhibition; Surface plasmon resonance.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

The quantitative ELLA method for the determination of dissociation constants of Con A – glycoprotein interaction

D.Mislovičová, J.Katrlík, J.Tkáč, E.Paulovičová and P.Gemeiner

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

The procedure for the determination of strength of interaction between Concanavalin A (Con A) and naturally mannosylated glycoproteins using enzyme-linked lectin binding assay (ELLA) was developed. Lectins are proteins or glycoproteins present in plants, microorganisms, animals and human organisms with specific affinity to monosaccharide or oligosaccharide structures of various compounds. The importance of both glycosylation and lectins in biological processes is known [1], however, deeper understanding of their role is actual fundamental task with strong impact to medicine, pharmacy and life sciences generally. Both the studies of carbohydrate-binding specificity of lectins and the investigation of carbohydrate structure of glycoproteins of various origin through the use of lectins are the main subjects of lectinomics [2-4]. In this work was studied the possibility of use of enzyme linked lectin binding assay (ELLA) for determination of apparent dissociation constants of glycoprotein - lectin interactions calculated by both the Liliom plot and the fitting method. A new method of ELLA-based determination of glycoprotein-lectin interaction was developed. Five glycoproteins were bound on solid highly charged polystyrene surface of immunoassay plates. The interaction of mannose-containing glycoproteins immobilized on MaxiSorp immunoassay plates with Con A was determined as amount of bound lectin *via* coupled peroxidase by spectrophotometry. The amount of lectin interacting with glycoproteins was determined at equilibrium conditions. The interactions of Con A with five mannose-containing glycoproteins, invertase (INV), glucoamylase (GA), glucose oxidase (GOD), ovalbumin (OVA), and transferrin (TRF) were quantified. Two methods of calculation were used.

1/ The equation developed by Liliom et al (odkaz) describes the linearized form of saturation curve.

$$1 / (1-i) = (c_0 / i) / (p / K_{Dapp}) - (F / V) (q / K_D) S_{Gp}$$

were i is relative saturation ($i = A_{490}/A_{490\max} = S_{ConA}/S_{ConA\max}$); p is the number of blocked epitopes *per mol* Con A; K_D/p is K_{Dapp} (apparent dissociation constant); c_0 is total concentration of Con A; F is reaction area; V is reaction volume; q is number of epitopes per glycoprotein macromolecule; S_{Gp} is concentration of glycoprotein on the plate surface. K_{Dapp} was calculated from the reciprocal slope of the plot. In presumptive univalent situation in which $p=1$, the K_{Dapp} may be equal to K_D .

2/ Method of calculation of K_{Dapp} by fitting to 1:1 binding model

This steady state binding model assumes specific 1:1 binding (binding to one site), and fits binding isotherms in accordance with equation 2.

$$A_{490} = A_{490\max} \cdot c_{ConA} / (K_{Dapp} + c_{ConA})$$

A_{490} is absorbance at 490 nm equal to the lectin concentration; $A_{490\max}$ is absorbance at 490 nm for maximum specific binding extrapolated to saturation concentration of lectin; c_{ConA} is lectin concentration; K_{Dapp} is equilibrium dissociation constant.

Two types of ELLA methods were used: a/ one-step method with Con A-HRP and two-steps method with Con A and AV-HRP.

Figure 1. The sorption curves of interaction Con A with glycoproteins INV (●), GA (■), and TRF (▲) determined by ELLA method with AV-HRP and OPD.

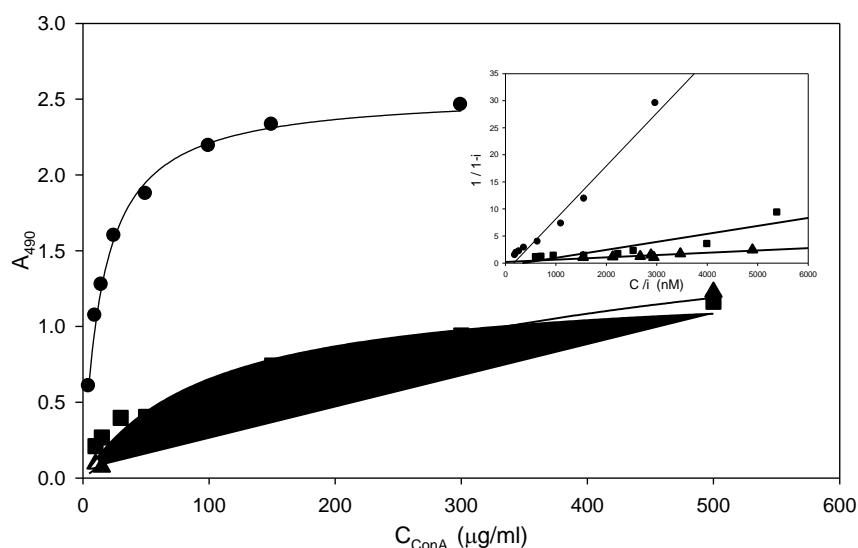


Table 1. Dissociation constants of interaction Con A – glycoproteins determined by ELLA method

Glycoprotein	ConA-HRP K_D (Liliom) [M]	ConA-HRP K_D (fitting) [M]	ConA + AV-HRP K_D (Liliom) [M]	ConA + AV-HRP K_D (fitting) [M]
GOD	2.76×10^{-7}	2.99×10^{-7}	2.02×10^{-7}	1.88×10^{-7}
OVA	1.82×10^{-6}	1.03×10^{-6}	4.78×10^{-7}	4.99×10^{-7}
GA	5.28×10^{-7}	4.43×10^{-7}	1.23×10^{-6}	0.97×10^{-6}
TRF	1.30×10^{-6}	1.50×10^{-6}	1.53×10^{-6}	1.81×10^{-6}
INV	3.42×10^{-7}	2.33×10^{-7}	1.74×10^{-7}	2.45×10^{-7}

ELLA method for determination of dissociation constants of five glycoproteins – Con A interactions was successfully used. Apparent K_D calculated were based on assumption of binding of one site of Con A to one site of glycoprotein (model 1:1). Both the linearization method and fitting of isothermal sorption curves, respectively were applied for calculation of K_D . The obtained values are comparable with those measured by other methods. Herein described ELLA method is suitable for determination of dissociation constants of glycoprotein - lectin interaction.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

1. A.M.Wu, E.Lisowska, M.Duk, Z.Yang, Glycoconj. J. 26 (2009) 899-913.
2. H.-J. Gabius, S.André, H.Kaltner, H.C.Siebert, Biochem.Biophys.Acta.157 (2002) 165-177.
3. D.Mislovičová, P.Gemeiner, A.Kozarova, T.Kožár, Biologia 64 (2009) 1-19.
4. P.Gemeiner, D.Mislovičová, J.Tkáč, J.Švitel, V.Pätoprstý, E.Hrabárová, G.Kogan, T.Kožár, Biotechnol.Adv. 27 (2009) 1-15.

The influence of different supports on application of immobilized glucose oxidase for biotransformation removal of glucose.

D. Mislovičová^a, E. Michálková^b, A. Vikartovská^a

^a Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

^b Faculty of Ecology and Environmental Science, Technical University Zvolen, T.G. Masaryka 24, SK-965 03, Zvolen, Slovakia

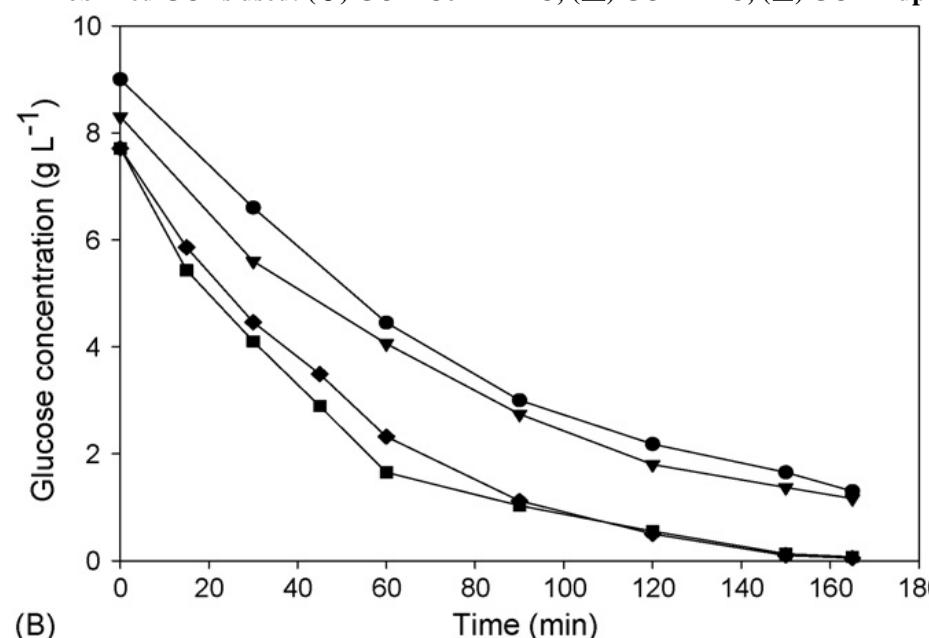
The aim of this study was to obtain an immobilized GOD suitable for the removal of glucose from pharmaceutical and food products. In the present work we have prepared and characterized four samples of *Aspergillus niger* GOD immobilized on bead cellulose and on Eupergit, either by covalent or biospecific binding. GOD was biospecifically bound to Concanavalin A-bead cellulose (GOD-ConA-TBC) and covalently to triazine-bead cellulose (GOD-TBC). Eupergit C and Eupergit CM were used for preparation of other two forms of immobilized GOD: GOD-EupC and GOD-EupCM. These immobilized preparations of GOD were used for a study of glucose biotransformation to gluconic acid and for the removal of glucose as an admixture of dextran.

Table 1. Characteristics of immobilized GODs

Immob. GOD	Content of GOD (mg prot./g of wet sorb.)	Dry weight (%; w/w)	Activity (units/g of wet sorb.)	Specific activity (units/mg of prot.)
GOD-TBC	0.65	14.6	23.5 ± 0.65	36.1
GOD-ConA-TBC	0.63	18.6	27.5 ± 2.05	43.7
GOD-EupC	0.81	22.8	22.2 ± 0.1	27.42
GOD-EupCM	0.87	33.0	21.4 ± 0.95	24.64

Figure 1. Bioconversion of glucose with four immobilized forms of GOD and from mixture of glucose with low molecular weight dextran .

Immobilized GODs used: (●) GOD-ConA-TBC; (▲) GOD-TBC; (■) GOD-EupC; (◆) GOD-EupCM.



GOD-ConA-TBC and GOD-EupC exhibited the best operational and storage stabilities. pH and temperature optima of these two immobilized enzyme forms were broadened and shifted to higher values (pH 7 and 35°C) in comparison with those of free GOD. The decrease of Vmax values after immobilization was observed, from 256.8 ± 7.0 mmol min⁻¹ mgGOD⁻¹ for free enzyme to 63.8 ± 4.2 mmol min⁻¹ mgGOD⁻¹ for GODConA-TBC and 45 ± 2.7 mmol min⁻¹ mgGOD⁻¹ for GOD-EupC, respectively. Depending on the immobilization mode, the immobilized GODs were able to decrease the glucose content in solution to 3.8–15.6 % of its initial amount. The best glucose conversion, was achieved by an action of GOD-EupCM on a mixture of 100 g dextran with 9 g of glucose (i.e. 98.7% removal of glucose).

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Enzymatic Oxidation and Separation of Various Saccharides with Immobilized Glucose Oxidase

D. Mislovičová, V. Pätoprstý, A. Vikartovská

*Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences,
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia*

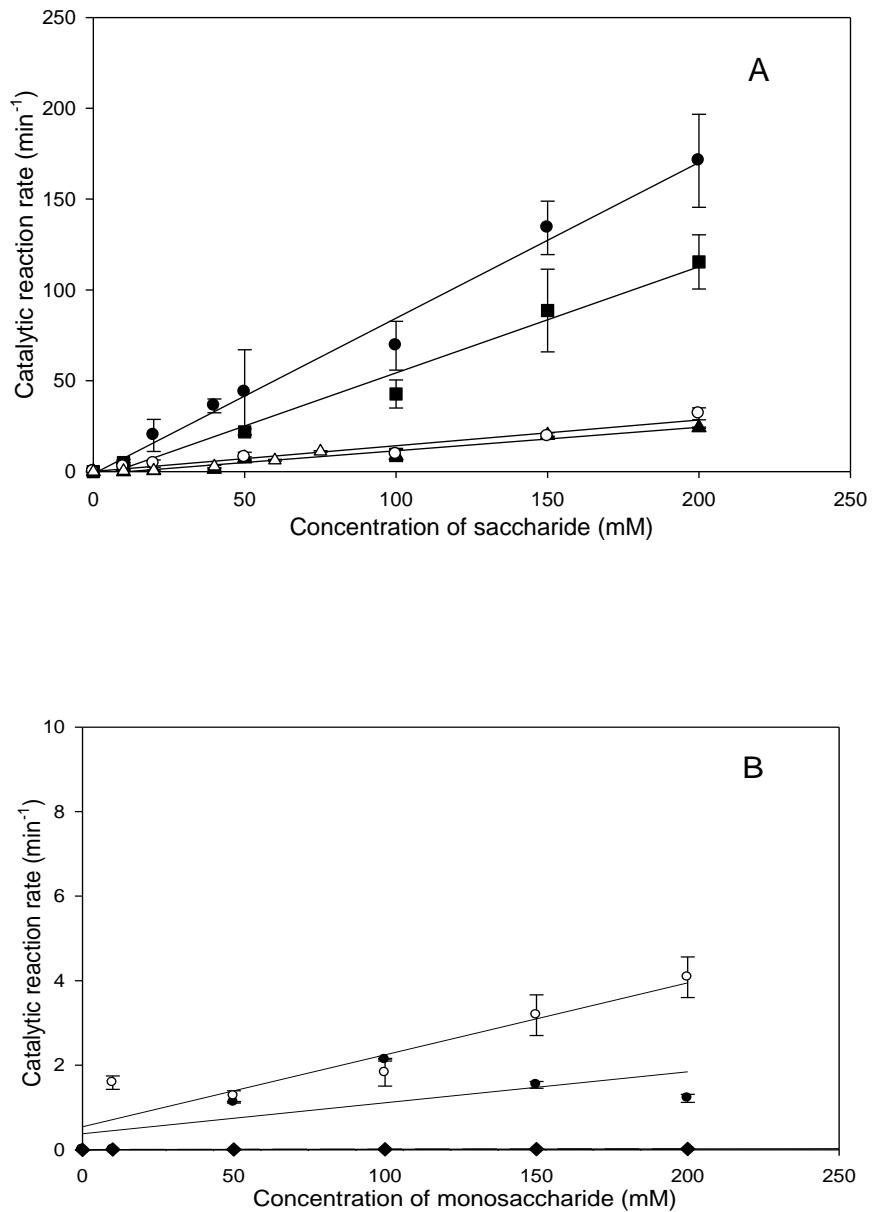
GOD from *Aspergillus niger* is a flavin-containing glycoprotein with extreme specificity for the substrate D-glucose. GOD has also been shown to be able to oxidize saccharides other than D-glucose [1-5], but these studies indicated that other saccharides were more slowly oxidized than D-glucose. The differences in oxidation rates of various saccharides indicate that certain structural features of the substrates are important for the enzymatic reaction. The great difference between the oxidation rate of D-glucose and the other saccharides was observed. The goal of the present work was to determine the oxidation kinetics of saccharides other than D-glucose using immobilized GOD on bead cellulose (GOD-TBC). The differences in reaction rates of individual saccharides were evaluated by monitoring the elimination of the more rapidly interacting saccharide (D-glucose, D-xylose) from a mixture with a more slowly reacting saccharide (D-xylose, D-cellobiose) or unreacting D-lyxose. Immobilized GOD on bead cellulose was used in the presence of immobilized CAT-Eupergit (CAT-Eup) to eliminate hydrogen peroxide produced. A simple co-immobilization of GOD together with CAT on the bead cellulose was used to obtain the mixed biocatalyst for efficient biotransformation of saccharide admixtures.

Table 1 Kinetic characteristics of enzymatic oxidation of various saccharides with GOD-TBC

Saccharide	kcat/K _M [mM ⁻¹ min ⁻¹]	Ratio of glucose/saccharide
D-Glucose	36.0	1
D-Mannose	0.8565	42
D-Galactose	0.5840	61.6
D-Xylose	0.1290	279.0
D-Fructose	0.1416	254.2
D-Cellobiose	0.1415	254.4
D-Sorbose	0.00732	4.92 × 10 ³
L-Sorbose	0.0170	2.11 × 10 ³
D-Arabinose	8.489 × 10 ⁻⁵	4.24 × 10 ⁵

Figure 1. Kinetics of catalytic oxidation of various saccharides with GOD-TBC

A - •-D-mannose, ■-D-galactose, ▲-D-xylose, ○-D-fructose, Δ-cellobiose
B - •-D-sorbose, ○-L-sorbose, ♦-D-arabinose



The differences between oxidation rates of saccharides with immobilized GOD have been utilized for the elimination of minor amounts of D-glucose from D-xylose or D-cellobiose (within 2–3 h) and D-xylose from D-lyxose (within 1 week) solution mixtures. The application of immobilized GOD has some advantages because of simple removal of glucose from reaction mixture with improved operational stability and reusability compared to the approach based on a soluble enzyme. The presence of immobilized CAT accelerated elimination of saccharide admixture and decreased the possibility of GOD inhibition with hydrogen peroxide produced.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

- [1] Wong, C.M., Wong, K.H., & Chen, X.D. (2008) Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 927-938.
- [2] Adams, E.C., Mast, R.L., & Free, A.H. (1960) Arch. Biochem. Biophys. 91, 230-234.
- [3] Pazur, J.H.,& Kleppe, K. (1964) Biochemistry 3, 578-583.
- [4] Lescovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., & Peričin, D. (2005) Int. J. Biochem. Cell. Biolog. 37, 731-750.
- [5] Pezzotti, F., & Therisod, M. (2006) Carbohydr. Res. 341, 2290-2292

The immobilized glucose oxidase as biocatalyst for removal of D-glucose from a mixture with D-mannose.

D. Mislovičová, J. Turjan, A. Vikartovská, V. Pätoprsty

Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38, Bratislava, Slovakia

Glucose oxidase (D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase) (GOD), catalyzes the oxidation of Glc to gluconolactone and hydrogen peroxide, using molecular oxygen as the electron acceptor. The product δ -gluconolactone spontaneously hydrolyzes to gluconic acid [1]. GOD from *Aspergillus niger* is known to be highly selective for Glc, which is thought to be its primary substrate. Other sugars can also be oxidized by GOD, but their oxidation rates are negligible compared with that of Glc [2,3]. To enhance enzyme properties such as reusability, operational stability, recovery and shelf life, GOD has been immobilized on different supports using various immobilization methods. The aim of this work was to develop a method for the complete removal of residual Glc from a Man solution that was prepared by

the epimerization of Glc. This procedure is based on the significant difference in oxidation rates of GOD for Glc and Man. GOD prepared in our laboratory in three different immobilized forms: GOD-triazine bead cellulose (GOD-TBC), GOD-Con A-triazine beadcellulose (GOD-Con A-TBC) and GOD-Eupergit (GOD-Eup) [4], was used in biotransformation procedure. An effective method to remove gluconic acid generated during Glc biotransformation was then developed.

Table 1. Results of GOD loading on supports.

Immobilized GOD	Activity immob. GOD [U/g wet biocat.]
GOD-TBC	35.4
GOD-Con A-TBC	52.0
GOD-Eup	24.5

Figure 1. Catalytic reaction rate of Glc or Man oxidation by immobilized GODs. ●- Glc, ○- Man on GOD-Con A-TBC; ■- Glc, □- Man on GOD-Eup; ▲- Glc, △- Man on GOD-TBC.

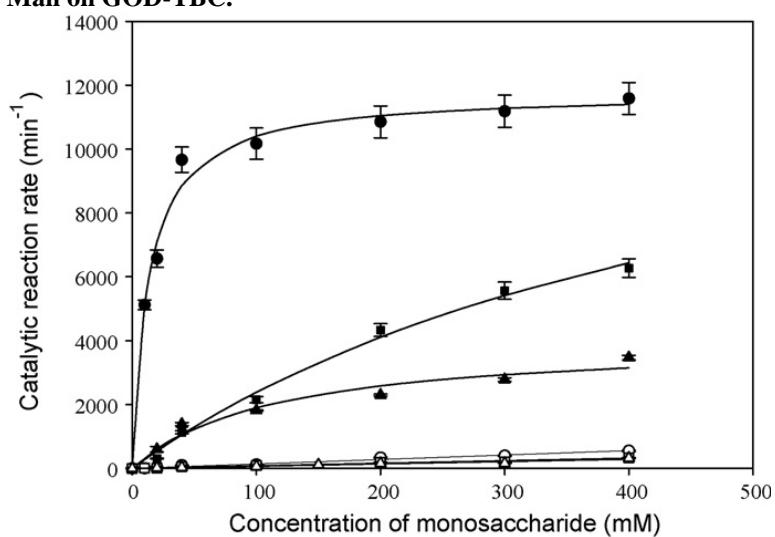
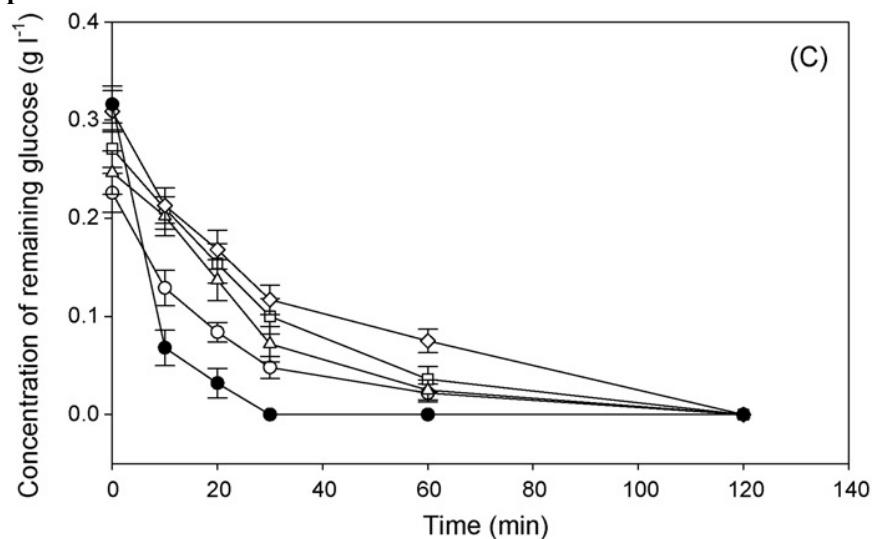


Figure 2. Bioconversion of Glc in a Man solution using GOD-ConA-TBC. Batch experiments in 10ml 50mMphosphate buffer (pH 6) with 0.96% Man and 0.04% Glc (w/v) under continuous aeration at 30 °C with: ○- 100mg, □- 66mg, △- 50mg and ◇-33mg GOD-Con A-TBC. ● 100mg of GOD-Con A-TBC with CAT-Eup 1:1 were used. 10 μ L of CAT solution was added to 100 μ L sample to remove hydrogen peroxide before Glc determination.



It was demonstrated that 0.04% Glc could be entirely removed from a 0.96% solution of Man using all three types of immobilized GOD (with specific activities ranging from 24.5 to 52 U/g of wet sorbent) in combination with immobilized CAT, within 1h under aeration with oxygen at 30 ° C. Although the rate of Glc oxidationwith GOD-Con A-TBC was much higher than with the other two immobilized GODs, GOD-TBC showed the best results in biotransformation experiments for Glc elimination and also demonstrated the best operational stability. Supplementing with immobilized catalase (to eliminate hydrogen peroxide) improved Glc removal and increased the operational stabilityof immobilized GOD during

repeated application. No decrease in the Man content after 2 h of biotransformation was observed. This result is consistent with the fact that Glc is a 50-times better substrate of GOD-TBC than Man. The complete removal of gluconic acid was achieved by precipitation with CaCl₂. Product desalting by ion exchange chromatography resulted in pure Man. Thus this method has the potential to remove higher contents of residual Glc from mixtures with other saccharides.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References.

1. V. Leskovac, S. Trivič, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, D. Peričin, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37 (2005) 731–750.
2. S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, C. Larroche, Food Technol. Biotechnol. 44 (2006) 185–195.
3. J.H. Pazur, K. Kleppe, Biochemistry 3 (1964) 578–583.
4. D. Mislovičová, E. Michalková, A. Vikartovská, Process Biochem. 42 (2007) 704–709.

Výskyt špecifických anti-*Candida* a anti-*Saccharomyces* protilátkových izotypov u pacientiek s kandidózami

Ružena Pilišiová, Ema Paulovičová

Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie imunochémie a glykokonjugátov Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava,

chemrupi@savba.sk

C. albicans je pôvodcom početných život ohrozujúcich oportúnnych infekcií u pacientov s AIDS. U pacientov s transplantáciou orgánov je najvyššie riziko fungálnej infekcie pri transplantácii pečene a kostnej drene.[1] Bunkovú stenu kvasiniek tvorí 80% polysacharidov (hlavne α -glukány, β -D-manány a chitín), 6-10% proteínov a 3-10% lipidov (vosky, neutrálne lipidy), prostredníctvom ktorej dochádza ku primárnej interakcii s hostiteľom, je zodpovedná za expresiu antigénov, adhéziu a intercelulárne interakcie. Rozpoznávanie kvasiniek hostiteľskými bunkami je založené na viacerých zložkách bunkovej steny, predovšetkým glykánach, ktoré predstavujú cca 90% bunkovej steny (β -1,3-D-glukány, β -1,6-D-glukány, chitín a manoproteíny) [2,3,4]. Úloha antikandidových špecifických protilátok v obrane hostiteľa bola predmetom viacerých výskumov. [5,6] Imunologická diagnostika kandidóz je založená na detekcii špecifických protilátok voči komponentom bunkovej steny kvasiniek. Anti-manánové a anti-glukánové protilátky sú prítomné v sére väčšiny zdravých ľudí, pričom ich patologický vzrast je zaznamenávaný pri rozvoji invazívnej kandidózy u imunokompromitovaných pacientov. Ako štúdie ukazujú pomocou anti-manánových polyklónových alebo monoklonových protilátok je možné detektovať antigenémiu u pacientov so systémovými kandidózami, čo naznačuje potenciál manánu ako imunomodulátora.[7]

Technika enzýmového imunosorbentného stanovenia (ELISA) je založená na reakcii antigénu s primárной protilátkou v sére, vzniknutý imunitný komplex sa detektuje sekundárной protilátkou, ktorá je značená enzýmom. Vyhodnotenie je založené na farebnej zmene, ktorá sprevádza reakciu enzým- substrát.[8]

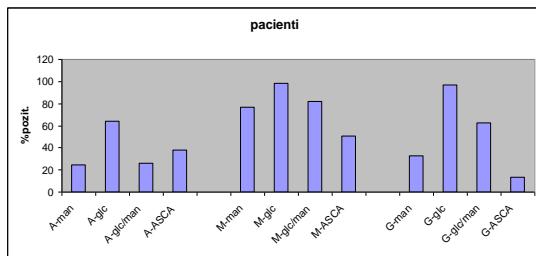
Materiál a metódy: Súbor sér od pacientiek s kolpitídami (n = 61, vek 35 ± 20) (Onkologický ústav Sv. Alžbety a Fakultná Nemocnica Staré mesto, kommerčne dostupné súpravy ELISA- anti- CANDIDA- II-A, G, M a ELISA- anti- ASCA- II- A, G, M (Biogema, Košice) 96 jamkové platničky, Elisa- reader (MRX II, Dynex, USA).

Na detekciu sme použili kommerčné súpravy ELISA-anti-CANDIDA-II-A, G, M (Biogema, Košice), kde sa použili adsorbované glykány bunkovej steny *C. albicans* serotyp A (CCY 29-3-302, Zbierka kvasiniek ChÚ SAV) ako zmes antigénne dominantných polysacharidov a ELISA-anti-ASCA-II-A,G, kde ako antigén je viazaný manán bunkovej steny *S. cerevisiae* (CCY 21-4-13, Zbierka kvasiniek ChÚ SAV). Okrem týchto kommerčných diagnostík sme sledovali anti- manánové protilátky (ako antigén bol použitý stenový manán *C. albicans* serotyp A z izolovaný z bunkovej steny) a anti α -D-glukánové protilátky (antigén- glukán) pomocou „home made“ modifikácie kommerčnej súpravy. Rozsah fyziologických hodnôt protilátok bol charakterizovaný na darcoch krvi (Biogema Košice).

Výsledky a diskusia: V klinických vzorkách boli identifikované špecifické protilátky voči

kvasinkovým imunogénom enzymovou imunosorbentovou metódou (ELISA). Podľa obrázka č.1 a 2 najvyššie koncentrácie sa pozorovali u špecifických protilátok triedy IgM voči glukánu *C. albicans*, avšak vyššie koncentrácie protilátok voči tomuto antigénu boli zaznamenané aj v ostatných izotypových triedach. Podobný charakter vykazovali aj manánové antigény *C. albicans* a *S. cerevisiae* s kulmináciou IgM a IgA izotypov protilátok.

Z výsledkov je možné usúdiť, že u väčšiny pacientov prebiehala akútna fáza infekcie spôsobená kvasinkami *C. albicans*, vzhladom k zvýšeným nameraným hodnotám protilátok IgM a IgA. Najvyššie hodnoty boli zaznamenané pri IgM voči glukánu *C. albicans* (306,86 U/ml) a najnižšie v triede IgA voči glukán/manán *C. albicans* (9,96 U/ml).



Obr. 1. Porovnanie percenta pozitívnych hodnôt voči vybraným antigénom. Ako graf dokazuje, najviac pozitívnych vzoriek bolo detektovaných v triede IgM voči glukánu *C. albicans*.

Záver: Kandidózy sú v dnešnej dobe veľmi aktuálny problém, nakoľko sa neustále zvyšuje percento pozitívnych klinických nálezov, objavuje sa rezistencia kvasiniek a tým sa priamo úmerne zvyšuje aj obtiažnosť liečby. Diagnostika je možná niekoľkými spôsobmi. Imunologická identifikácia je založená na *in vitro* testoch detektovania špecifických protilátok, vďaka čomu je možné určiť štádium ochorenia, prípadne sledovať jeho priebeh. V našej práci sme sa zamerali na charakterizáciu súboru klinických vzoriek pacientiek s kolpitídami. Zistili sme až 98 % IgM pozitívnych výsledkov voči glukánu *C. albicans* a 96% v triede IgG, ale aj 77% IgM pozitívnych vzoriek na manán *C. albicans*. Prekvapujúce bolo aj vysoké percento pozitívnych hodnôt IgM na manán *S. cerevisiae*, nakoľko pacientky trpeli kandidovými kolpitídami.

Literatúra na požiadanie u autora

Podákovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Stanovovanie fagocytovej aktivity neutrofilov imunizovaných Balb/c myší

Ružena Pilišiová¹, Ema Paulovičová¹, Lucia Paulovičová¹, Alexander A. Karelín², Yury E. Tsvetkov², Nikolay E. Nifantiev²

¹ Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum Excelentnosti Glycomed,
Dúbravská cesta 9, Bratislava

² Ruská akadémia vied, N.D. Zelinského inštitút organickej chémie,
Leninskiy prospekt 47, Moskva

chemrupi@savba.sk

Vo všeobecnosti 65- 90% bunkovej steny tvoria β -1,3- a β -1,6-D- glukány, ktoré sú považované za hlavné štruktúrne komponenty.[1, 2, 3] Fagocytóza patrí k hlavným mechanizmom vrodenej nešpecifickej bunkovej imunitnej odpovede pri obrane hostiteľa na prítomnosť cudzieho elementu. Ide o pomerne komplikovaný, viacstupňový proces, ktorý zahŕňa: aktiváciu buniek obranného mechanizmu hostiteľa, chemotaxiu, opsonizáciu, adhéziu, pohlenie, následné respiračné vzplanutie a deštrukciu nepotrebného materiálu.[4] Profesionálnym fagocytom môžu byť ponúknuté okrem kommerčne dostupných mikrobiálnych agens aj inaktivované fluorescenčne označené kvasinky a hýfy *C. albicans*. Fagocytóza a respiračné vzplanutie neutrofilov sa potom detektuje hydroxyetídin bromidom (HE), ktorý sa po excitácii (pri 483 nm) pretransformuje na etídium bromid, ktorý je schopný sa interkalovať do DNA buniek.

Hlavným cieľom práce bolo sledovanie fagocytovej aktivity a respiračného vzplanutia neutrofilov imunizovaných Balb/c myší (imunizovaných synteticky pripraveným nonaglykozid-BSA konjugátom) po jednotlivých podaniach.

Materiál a metódy: Balb/c myši (samičky, 6-8 týždňové), nonaglykozid -BSA konjugát

(9 glukózových jednotiek naviazaných na proteínový nosič BSA- hovädzí sérový albumín), kvasinková forma rastu *C. albicans* (CCY 29-3-32) označená s FITC (fluoresceín isotiokyanát), hýfová kultúra *C. albicans* (CCY 29-3-32) označená s FITC, roztok hydroxyetidínu (HE, PolySciences, USA), ACK lyzačný roztok, prietokový cytometer (FC 500, Beckman Coulter, USA)

Imunizácia laboratórnych myší Balb/c: laboratórne myši boli imunizované testovaným konjugátom (dávka 28,455 μ g/100 μ L/myš). Imunizačné dávky a následné odbery (celkovo 3) boli realizované v trojtýždňových intervaloch, krv z orbitálneho plexu bola odobratá do Li-heparínových skúmaviek.

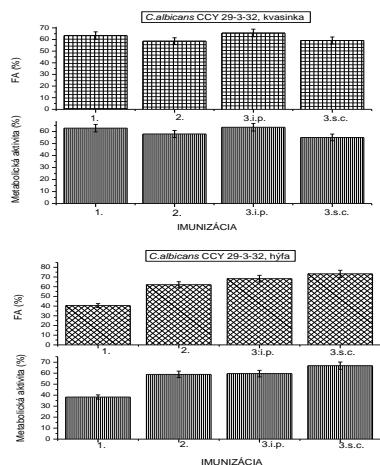
Príprava fluorescenčne označenej kvasinkovej a hýfovej kultúry *C. albicans*: kultúry kvasiniek a hýf boli inaktivované 70% etanolom a označené FITC (1mg/ml v karbonát bikarbonátovom pufri, pH 9,6).

Stanovenie fagocytovej aktivity a respiračného vzplanutia pomocou prietokového cytometra: vzorky testovanej krvi (dve skupiny každej vzorky- pre meranie bazálnej a indukovanej fagocytózy a spontánneho vzplanutia) boli inkubované v 15 minútových intervaloch najprv v roztoku hydroxyetidínu vo vodnom kúpeli pri 37°C, následne k nim boli pridané fluorescenčne označené kvasinky a hýfy (ku kontrolnej skupine vzoriek, pre meranie spontánneho vzplanutia, boli až tesne pred meraním). Erytrocyty boli zlyzované ACK

lyzačným roztokom pri 0°C a následne bola fagocytová aktívita a respiračné vzplanutie neutrofilov merané na prietokovom cytometri. (FC 500, Beckman Coulter, USA). [5]

Výsledky a diskusia: V práci sme testovali vplyv (takto pripraveného nonaglykozid-BSA konjugátu (\square -Glc-1-3)₉-(CH₂)₃NH-SPACER-BSA, kde glukooligomérna časť konjugátu predstavuje časť z natívnej molekuly \square -glukánu *C. albicans*) na Balb/c myši.

Schopnosť buniek fagocytovať a respiračne vzplanúť je možné sumárne označovať ako metabolickú aktívitu fagocytov. V práci sme testovali ich schopnosť pohltiť rôzne morfoformy *C. albicans*: kvasinkovú aj hýfovú kultúru *C. albicans* CCY 29-3-32. (Obr.1)



Obr.1 Porovnanie fagocytózy a metabolickej aktivity indukovanej *C. albicans* CCY 29-3-32 kvasinkovou a hýfovou formou po jednotlivých podaniach testovanej formuly.

Ako z grafov vyplýva vzostupný trend fagocytovej aktivity bol pozorovaný pri hýfovom modeli, v prípade kvasinkového modelu sme pozorovali zvýšenie fagocytovej aktivity až po 3.intraperitoneálnom podaní. (Tab.1)

Tab. 1 Porovnanie fagocytovej aktivity a celkovej metabolickej aktivity v porovnaní po 1. a 3.podaní testovacej látky. V prípade hýfovej formy rastu *C. albicans* dochádzalo ku postupnému zvyšovaniu , kým u kvasinkovej formy rastu došlo ku zvýšeniu až po 3.intravenóznom podaní.

<i>C.albicans-</i> hýfa	FA (%)	Metabol.aktivita (%)
3.i.p. vs.1.	27,8	21,3
3.s.c. vs.1.	32,8	28,5
3.s.c. vs.3.i.p.	5	7,2
<i>C.albicans-</i> kvasinka	FA (%)	Metabol.aktivita (%)
3.i.p. vs.1.	2,2	0,8
1. vs.3.s.c.	4,2	7,7
3.i.p. vs.3.s.c.	6,4	8,5

Rôzne prezentácie mikroorganizmov fagocytom sú spojené s odlišnou veľkosťou a stavbou povrchov testovaných mikroorganizmov. Fungálna bunková stena je zložená z chitínových, β -

glukánových polymérov a manoproteínov. Ako bolo dokázané [6], pri prepnutí kvasinkových buniek na hýfy dochádza aj k prestavbe bunkovej steny: v kvasinkovej bunkovej stene je dominantná α -glukánová vrstva, kým v hýfovej manoproteínová vrstva. Tým je možné vysvetliť aj rôzne rozpoznávanie manoproteínovými receptormi (Galektín 3, TLR 4, Fc- α Dectin 2, DC-SIGN a i.) a glukánovými receptormi (TLR 2, TLR6, Dectin 1) a následne iný spôsob spracovania internalizovaného mikrobiálneho agens.a indukcie respiračného vzplanutia.

Záver: Výsledky našej experimentálnej práce poukazujú na rozdielne rozpoznávanie a spracovanie mikrobiálnych agens neutrofilmami v závislosti na morfotype *C. albicans*.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Fagocytová aktivita neutrofilov indukovaná synteticky pripraveným nonaglukozid - BSA konjugátom u Balb/c myší

Ružena Pilišiová¹, Ema Paulovičová¹, Lucia Paulovičová¹, Alexander A. Karelín², Yury E. Tsvetkov², Nikolay E. Nifantiev²

¹ Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum Excelentnosti Glycomed,
Dúbravská cesta 9, Bratislava

² Ruská akadémia vied, N.D. Zelinského inštitút organickej chémie,
Leninskiy prospekt 47, Moskva

chemrupi@savba.sk

Fagocytóza patrí k hlavným mechanizmom vrodenej nešpecifickej bunkovej imunitnej odpovede hostiteľa. K profesionálnym fagocytom patria polymorfonukleárne granulocyty-neutrofily a eozinofily. K ďalšiemu typu buniek patria aj monocyty a ich tkanivové varianty makrofágy. Fagocytóza je pomerne komplikovaný, viacstupňový proces, ktorý zahŕňa: aktiváciu buniek obranného mechanizmu hostiteľa, chemotaxiu, opsonizáciu, adhéziu, pohlenie, následné respiračné vzplanutie a deštrukciu nepotrebného materiálu. [1] Už od zahájenia pohlenia cudzorodej látky makrofágom dochádza k aktivácii hexózo-monofosfátového skratu (pentázovému cyklu), počas ktorého sa tvorí relatívne veľké množstvo NADPH. Aktiváciou NADPH-oxidázy v aeróbnom prostredí enzym katalyzuje premenu NADPH na NADP⁺ a vznikajú silné mikrobicídne metabolity akými sú superoxidový anión, peroxid vodíka, singletový kyslík a hydroxylový radikál. Od začiatku fagocytózy dochádza aj k metabolickej aktivácii fagocytu-respiračnému (oxidačnému) vzplanutiu.[2] Profesionálnym fagocytom môže byť ponúknutý napr. inaktivovaný *Staphylococcus aureus* viazaný na inertné partikuly [3], inaktivované kvasinky a hýfy resp. MSHP (mikrosférické hydrofilné partikule, Artim s.r.o). Fagocytóza a následné respiračné vzplanutie neutrofilov sa detektuje hydroxyetidín bromidom (HE), ktorý sa po excitácii (pri 483 nm) pretransformuje na etidium bromid, ktorý sa interkaluje do DNA buniek, ktoré respiračne vzplanuli. Použitie dvoch rôznych fluorochrómov umožňuje simultánne meranie fagocytovej aktivity buniek a respiračného vzplanutia v jednej vzorke krvi na prietokovom cytometri. Hlavným cieľom práce bolo sledovanie fagocytovej aktivity a respiračného vzplanutia neutrofilov imunizovaných Balb/c myší (imunizovaných synteticky pripraveným nonaglykozid-BSA konjugátom) po 1., 2. a 3.podaní konjugátu.

Materiál a metódy: Balb/c myši (samičky, 6-8 týždňové), nonaglukozid -BSA konjugát

(9 glukózových jednotiek naviazaných na proteínový nosič BSA (hovädzí sérový albumín), *Staphylococcus aureus* označený fluorescením (SPA-FITC, Invitrogen), roztok hydroxyetidínu (HE, Polysciences, USA), ACK lyzačný roztok, prietokový cytometer (FC 500, Beckman Coulter, USA)

Imunizácia laboratórnych myší Balb/c: laboratórne myši boli imunizované testovaným konjugátom (dávka 28,455µg/100µL/myš). Imunizačné dávky a následné odbery (celkovo 3) boli realizované v trojtýždňových intervaloch, krv z orbitálneho plexu bola odobratá do Li-heparínových skúmaviek.

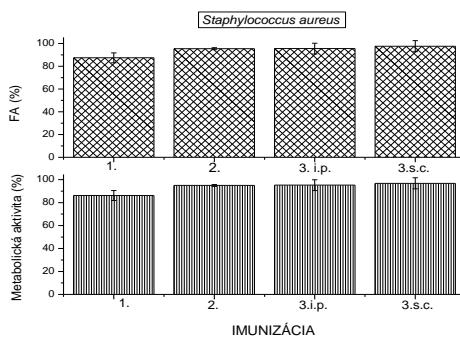
Stanovenie fagocytovej aktivity a respiračného vzplanutia pomocou prietokového cytometra: vzorky testovanej krvi (dve skupiny každej vzorky- pre meranie bazálnej a indukovanej fagocytózy a spontánneho vzplanutia) boli inkubované v 15 minútových

intervaloch najprv v roztoku hydroxyetidínu vo vodnom kúpeli pri 37°C, následne k nim boli pridané fluorescenčne označené SPA (ku kontrolnej skupine vzoriek, pre meranie spontánneho vzplanutia, boli až tesne pred meraním). Erytrocyty boli zlyzované ACK lyzačným roztokom pri 0°C a následne bola fagocytová aktívita a respiračné vzplanutie neutrofilov merané na prietokovom cytometri. (FC 500, Beckman Coulter, USA). [5]

Výsledky a diskusia: Rezistencia, tvorba biofilmu a i. sú faktory, ktoré komplikujú liečbu kandidóz. Preto sa výskum orientuje na hľadanie spôsobov liečby resp. profylaxie pre pacientov s kandidózami. Jednou z možností je glykokonjugátová vakcína – pripravená konjugáciou kandidového manánového resp. iného glykánového antigénu na vhodný proteínový nosič. V práci sme testovali vplyv (takto pripraveného nonaglykozid-BSA konjugátu (\square -Glc-1-3)₉-(CH₂)₃NH-SPACER-BSA, kde glukooligomérna časť konjugátu predstavuje časť z natívnej molekuly

\square -glukánu *C. albicans*) na Balb/c myši.

Schopnosť buniek fagocytovať a respiračne vzplanúť je možné sumárne označovať ako metabolickú aktivitu fagocytov. V práci sme testovali ich schopnosť pohltiť opsonizované partikule *Staphylococcus aureus* (SPA-FITC) (Obr.1).



Obr.1 Porovnanie fagocytovej aktivity a metabolickej aktivity indukovanej *S. aureus* partikulami (SPA) po jednotlových podaniach testovanej formuly.

Tab. 1 vyjadrujúca porovnanie fagocytovej aktivity a celkovej metabolickej aktivity v porovnaní po 1. a 3. podaní testovacej látky. V prípade SPA dochádzalo ku postupnému zvyšovaniu.

SPA	FA (%)	Metabol.aktívita (%)
3.i.p. vs. 1.	8,1	9
3.s.c. vs. 1.	10,2	10,6
3.s.c. vs. 3.i.p.	2,1	1,6

Záver: Práca bola zameraná na testovanie indukovej fagocytovej aktivity a simultánneho respiračného vzplanutia neutrofilov počas vakcinácie použitím komerčne dostupných fluorescenčne značených *Staphylococcus aureus* partikúl (SPA- FITC) na overenie možného vplyvu imunizácie nonaglykozid- BSA konjugátom na funkčnosť neutrofilov. Výsledky našej experimentálnej práce poukazujú na rozpoznávanie a spracovanie mikrobiálnych agens neutrofilmi s dôrazom na dimorfizmus *C. albicans*.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra:

- [1] Hořejší V. a Bartůňková J. J. (2009) Základy imunológie. *Triton*, Praha, 4.vydanie, p.33.
- [2] Buc M. (2009) Základná a klinická imunológia. *UK*, Bratislava, p.117.
- [3] Webster S.D., Galvan M.D., Ferran E. *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166, p.7496.
- [4] Bobovčák M. (1998) Atestačná práca. Klinické laboratórium-VÚCH P. Nová Polianka.
- [5] Paulovičová E., Korcová J., Farkaš P. *et al.* (2010) *J. Med. Microbiol.* 59, p.1440.

Mechanizmy rezistencie patogénnych kvasiniek

Ružena Pilišiová, Ema Paulovičová

Chemický ústav, Centrum Excelentnosti Glycomed, Slovenská akadémia vied,
Dúbravská cesta 9, Bratislava

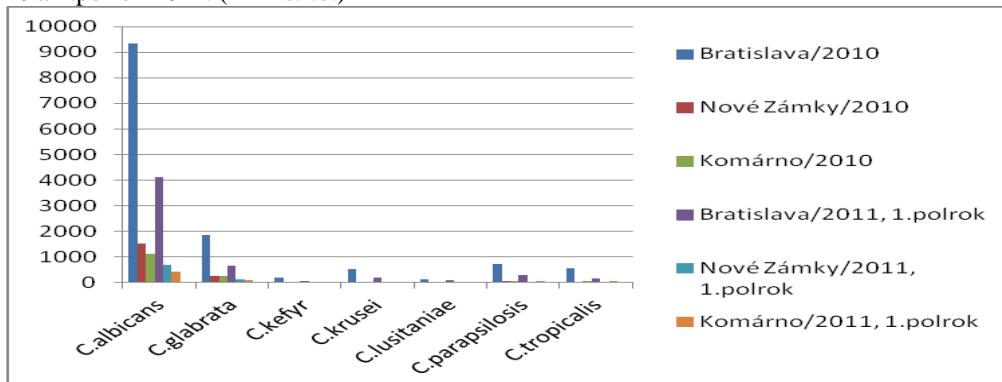
chemrupi@savba.sk

Kvasinkové infekcie sú v súčasnej dobe vážnym terapeutickým problémom, ale na druhej strane veľká výzva pre výskumné tímy- hľadať, skúmať a pomôcť lekárom, no hlavne pacientom v boji s komplikovanými a veľmi nepríjemnými ochoreniami.

Pôvodcom kvasinkových infekcií sú v prevažnej miere fakultatívne patogénne kvasinky rodu *Candida*: *C. albicans* (50-60%), *C. glabrata* (15-20%), *C. parapsilosis* (10-20%),

C. tropicalis (6-12% a i., Tab.1.) ako aj rody *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*. [1]

Tab.1 Porovnanie počtu izolovaných rôznych druhov kvasiniek rodu *Candida* v rôznych mestách na Slovensku za rok 2010 a 1.polrok 2011. (HPL s.r.o.)



Infekcie, ktoré sú vyvolané kvasinkami rodu *Candida* - kandidózy, je možné rozdeliť do dvoch kategórii a to: (i) superficiálne mukokutánne a (ii) systémové invazívne, ktoré vznikajú masívnym rozšírením buniek v krvnom riečišti a v hlavných orgánoch (kandidémia). Systémové kandidózy sú často fatálne. K najčastejším superficiálnym patria aj vulvovaginálne kandidózy, s ktorými sa stretne až 75% žien aspoň 1x za život V mnohých prípadoch prejdú opakujúce sa infekcie do chronického štátia. K hlavným faktorom, ktoré môžu mať za následok prenutie na patogénnu formu patria: zmeny na epiteli ako sú pH, zmeny pomeru glukóza/glykogén, alebo zmeny epiteliálnej integrity.[2]

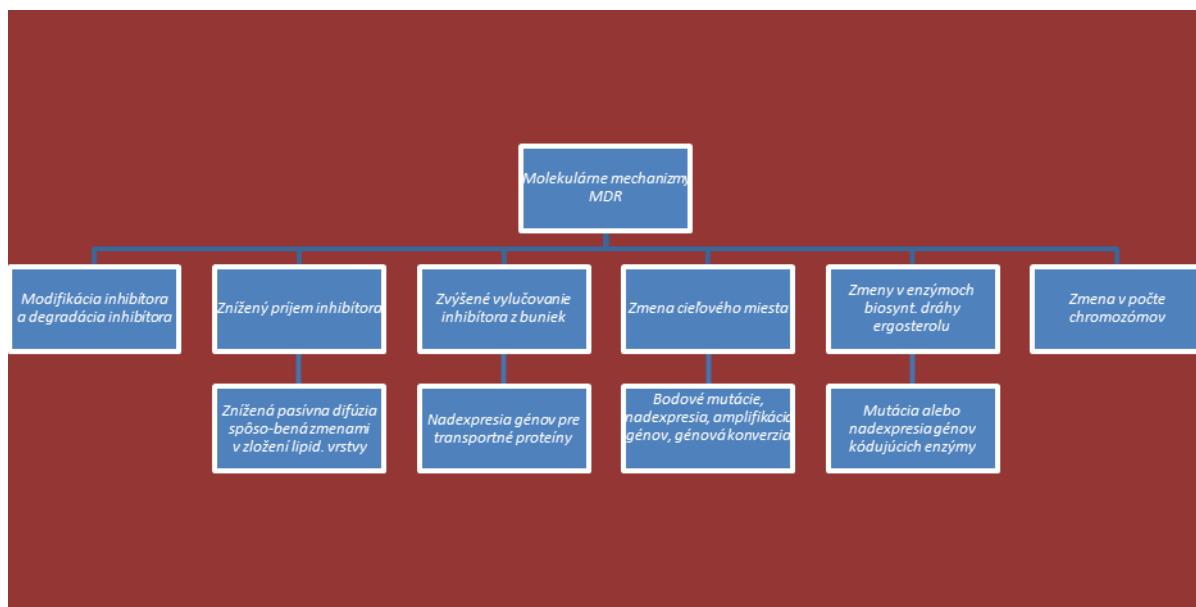
Problémy pri liečbe spôsobuje aj fenomén mnohonásobnej rezistencie (MDR- multidrug resistance), ktorý vzniká najmä hyperexpressiou membránových proteínov, ktoré vylučujú xenobiotiká von z bunky, ale aj ďalšími mechanizmami rezistencie.[3]

Mikroorganizmy vytvárajú genetickú variabilitu niekoľkými odlišnými spôsobmi:

hromadením bodových mutácií, zmenami v genetickom usporiadaní a získavaním nového genetického materiálu horizontálnym transferom génov.

Tieto mechanizmy umožňujú rýchly vývin nových variantov s podstatne zmenenými vlastnosťami a to využívaním „už hotového“ genetického materiálu iných organizmov.

Typickým príkladom môžu byť aj mechanizmy virulencie ako „*phase variation*“ (exprimovanie či neexprimovanie jednotlivých génov) alebo „*antigenic variation*“ (zmena mikrobiálnej štruktúry).



Obr.1 Molekulárne mechanizmy MDR u fungálnych patogénov. (Imrichová a Gbelská, 2004)

V klinickej praxi sa na terapiu mykóz používajú liečivá patriace do piatich hlavných skupín: polyény, azoly, alylamíny, echinokandíny a fluoropyrimidíny. Cieľovým miestom prvých troch skupín sú produkty génov zahrnutých v biosyntéze ergosterolu, ktorý je hlavnou zložkou sterolov vo fungálnej cytoplazmatickej membráne. Inhibítory biosyntézy ergosterolu narúšajú funkciu ergosterolu v bunkách.

K najpreštudovanejším mechanizmom rezistencie patria: nadexpresia membránových transportných púmp typu ABC a MFS, mutácie v cieľovom mieste, zmeny v zložení lipidov bunkovej membrány, zvýšená expresia cieľového miesta a zvýšená expresia génov kódujúcich efluxné pumpy.[4]

Podákovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra:

- [1] **Vazquez J.A. a Sobel J.D.** (2003) Candidiasis In: Dismukes W.E., Pappas P.G., Sobel J.D. Clinical mycology. New York: Oxford Univers: 143-187.
- [2] **Yang Y.L.** (2003) Virulence factors of *Candida species*. *J Microbiol Immunol Infect.* **36:** 223-228.
- [3] **Gulshan K. a Moye-Rowley W.S** (2007) Multidrug resistance. *Eucaryotic cell.* **(6) 11:** 1933-1942.
- [4] **Imrichová D. a Gbelská Y.** (2004) Mnohonásobná rezistencia. *Biologické listy.* **69:** 215-236.

T_H DIFFERENTIATION INDUCED BY SYNTHETIC CANDIDA-DERIVED OLIGOSACCHARIDES IN BALB/C MICE

E. Paulovičová¹, L. Paulovičová¹, R. Pilišiová¹, A. A. Karelín², Y. E. Tsvetkov², N. E. Nifantiev²

¹Slovak Academy of Sciences, Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Center of excellence Glycomed, Dept. Immunochemistry of Glycoconjugates, Bratislava, Slovakia

²Laboratory of Glycoconjugate Chemistry, N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Candida albicans, polymorphic yeast has become one of the most widespread source of infection in immunocompromised patients and those with predisposition (e.g. bone marrow transplantation, malignancies, long-term treatment with antibiotics, chemotherapeutics, glucocorticoids or other immunosuppressive agents). Mortality caused by *C. albicans* and non-albicans systemic infections varies from 15-35 %. T lymphocytes are crucial mediators of the cellular antifungal immune response. The early response of naive CD4⁺ T cells to antigenic stimulation (*Candida* yeast and/or hyphae) via pattern-recognition receptors (e.g. Dectin-1, Dectin-2, MR, CR3, DC-SIGN, Galectin-3) is characterized by induced proliferation. Further T_H differentiation give arise of cells with a significant potential for cytokine expression. Depending upon the balance of local cytokines, costimulatory molecules, antigen levels, and genetic factors T_H1, T_H2, T_H17 effector and/or memory cells and Tregs' are generated by immune responses. Functionally-polarized CD4⁺ T cell subsets have been identified based on their exclusive patterns of various cytokine secretion.

Several carbohydrate moieties e.g. mannans and glucans of outermost cell-wall layer of *Candida* have been shown to be important in mutual host-fungal interactions and *Candida* virulence. The efficiency of *Candida* glycan antigens to trigger acquired immunity particularly induction of T_H cell mediated immune responses is the main consideration in selecting an appropriate carbohydrate antigen for future vaccine design and development.

The aim of this study was to evaluate the immunobiological efficacy of semisynthetic mannan-and glucan-derived oligosaccharidic conjugates. Prime-boost vaccination of Balb/c mice with synthetic-BSA conjugated heptamannoside and nonaglucoside revealed pro-T_H1 over T_H2 immune responses based on increasing frequency of IFN- γ and decreasing frequency of IL-4 producing splenocytes throughout the i.p and or s.c immunisation routes. Acceleration of T_H17 and depression of Tr responses were generated predominantly by immunisation with nonaglucoside conjugate. Induction of specific T_H1, T_H2, T_H17 and Tr cytokine release by both conjugated oligosaccharides throughout the prime-boost vaccination demonstrated on activated mice splenocytes allows to detect immunobiological diversity of such oligosaccharidic constructs suitable for subcellular *Candida* vaccine formula.

Material and Methods: immunised Balb/c mice(2nd,3d i.p a/o s.c boost, 6wks after 3d), isolated splenocytes 2,2 – 2,9x10⁶ cells/mL, immunisation formulas: mannan and glucan-derived synthetic oligosaccharidic conjugates i.e heptamannoside (M7) and nonaglucoside (G9) BSA conjugates,

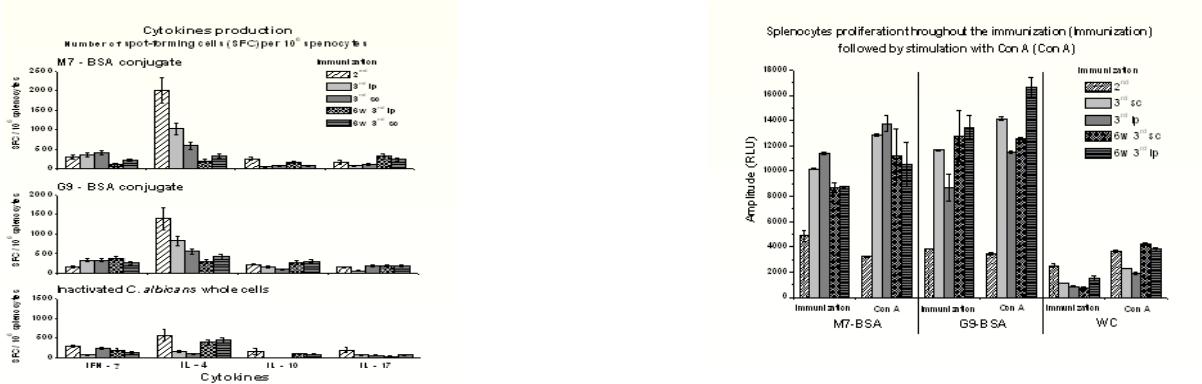


A.

B

Figure 1 Schematic representation of the structure M7-BSA (A) and G9-BSA (B) conjugates.

Candida whole cell formula (WC) , Mouse IL-4,Mouse IL-10, Mouse IL-17 and Mouse IFN- γ ELISpot (e-Bioscience), Axio Imager.A1, KS ELISPOT 4.10 (C.Zeiss), ViaLight Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay (Lonza)



1.

2.

Figure 2 Cytokine production (1) and splenocytes proliferation during the immunization (2).

The novel synthetized glycooligosaccharidic conjugates mimicking the structure of native *Candida* mannooligosaccharide and glucooligosaccharide demonstrate immunobiological efficacy *in vivo*. These model structures offer opportunity to follow up relationships between structure and immunobiological effectivity. Prime-boost vaccination of Balb/c mice with synthetic-BSA conjugated heptamannoside and nonaglucoside revealed pro-T_H1 over T_H2 immune responses based on increasing frequency of IFN- γ and decreasing frequency of IL-4 producing splenocytes throughout the i.p and/or s.c immunisation routes. Acceleration of T_H17 and depression of Tr responses were generated predominantly by immunisation with nonaglucoside conjugate. Immunomodulation of specific T_H1, T_H2, T_H17 and Tr cytokine release by both conjugated oligosaccharides throughout the vaccination demonstrated on activated mice splenocytes allows to detect immunobiological diversity of such oligosaccharidic constructs suitable for *Candida* vaccine.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Glykány bunkovej steny *C. albicans* a ich imunogénnosť

Paulovičová E.¹, Paulovičová L.¹, Pilišiová R.¹, Karelín A.A.², Tsvetkov Y-E.², Nifantiev N.E.²

¹Chemický ústav, Centrum Excelentnosti Glycomed, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, Bratislava

²N.D. Zelinského inštitút organickej chémie, Ruská akadémia vied,
Leninskiy prospekt 46, Moskva

chemrups@savba.sk

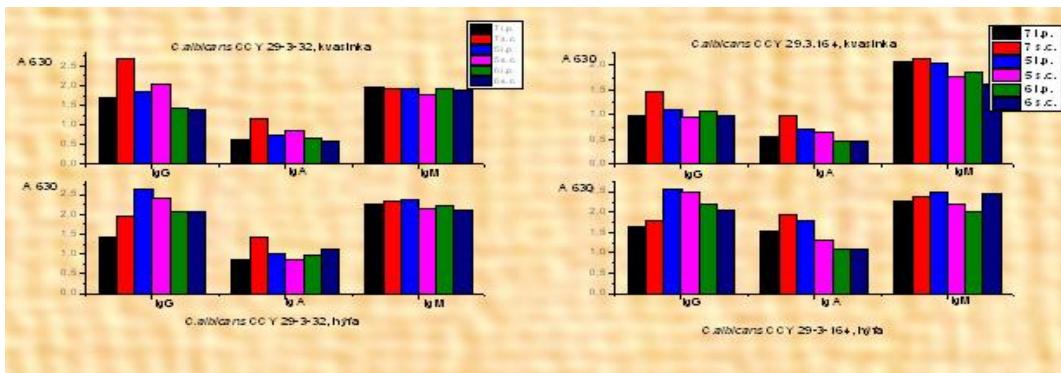
Úvod: Epidemiológia invazívnych ochorení, ktoré spôsobuje oportúnna dimorfná kvasinka

C. albicans sa za posledých tridsať rokov rýchlosťou zmenila. Vzostup patogénnych kandidí sa pozoruje prevažne u imunokompromitovaných jedincov, pričom *C. albicans* je najfrekventovanejší výskyt *C. glabrata*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*. Na Slovensku je napr. *C. albicans* najčastejšie izolovaným etiologickým agensom pri vulvovaginálnych infekciách (88,033%, HPL, 2010). Bunková stena kvasiniek a jej dominantné glykány ako β -D-glukán a α -manán majú dôležitú úlohu pri vzájomných interakciach s imunokompetentnými bunkami hostiteľského organizmu. Pri architektúre bunkovej steny sa v rámci virulentnosti výraznou mierou podieľa dimorfizmus. Zistilo sa, že preferencia glykánov na bunkovom povrchu sa mení s fungálnym morfotypom, štúdia s Dectin-1 potvrdila, že β -D-glukán, zvyčajne maskovaný hrubou vrstvou manoproteínu je počas počiatocnej tvorby výpučkov prítomný na bunkovom povrchu v podobe diskrétnej nesúvislej vrstvy [1]. Modelové synteticky pripravené oligoglykány simulujúce natívne oligosacharidové štruktúry bunkovej steny predstavujú atraktívny model pre sledovanie interakcií na úrovni hostiteľa ako aj invadujúceho patogénu.

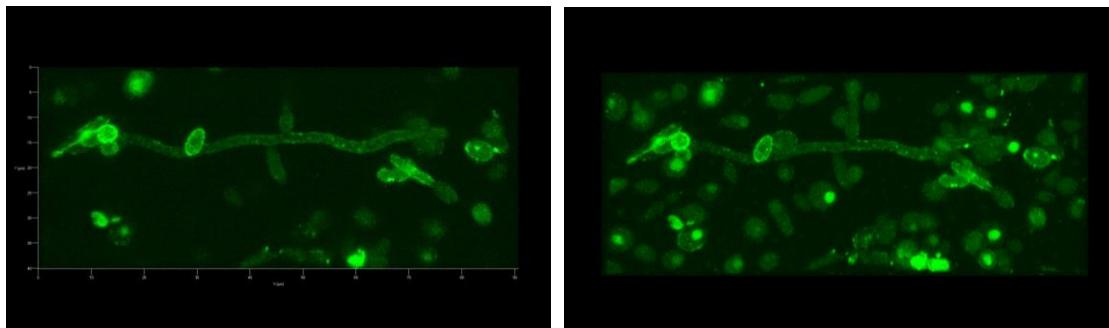
Materiál a metódy: klinické izoláty *C. albicans* CCY 29-3-32 a CCY 29-3-164 (Zbierka kvasiniek, Chemický ústav, SAV) v kvasinkovej aj hýfovej forme rastu, post- vakcinačné séra anti-heptamanozid-, anti-hexamanozid- a anti-pentamanozid- BSA konjugáty, anti-mouse IgA-FITC, IgM-FITC, IgG-FITC, fluorescenčný a konfokálny mikroskop (LSM, Carl Zeiss, Germany).

Výsledky a diskusia: Zastúpenie a reaktivita Ig izotypov postvakcinačných sér sa charakterizovali celobunkovou ELISA metódou (Obr.1), použila sa imobilizovaná kvasinková a hýfová forma rastu oboch kmeňov *C. albicans*. Špecifickosť post- vakcinačných sér (myšacie-anti-manozidové polyvalentné protilátky) a ich schopnosť rozlíšiť natívne oligosacharidové sekvencie v bunkovej stene rôznych morfológií klinického izolátu

C. albicans sa potvrdila technikou nepriamej imunofluorescencie *in situ*.



Obr.1. Výskyt jednotlivých Ig izotypov post-vakcinačných sér.



Obr.2 Imunorozpoznávanie *C.albicans* CCY 29-3-32 a CCY 29-3-164 kvasinkovej a hýfovej formy rastu post-vakcinačnými sérami (vakcinácia heptamanozid-, hexamonozid- pentamanozid- BSA konjugátmi) (LSM 63x, Carl Zeiss, workshop, 2010).

Špecifickosť post- vakcinačných sér (myšacie-anti-manozidové polyvalentné protilátky) a ich schopnosť rozlísiť natívne oligosacharidové sekvencie v bunkovej stene rôznych morfotípiom klinického izolátu *C. albicans* sa potvrdila technikou nepriamej imunofluorescencie *in situ*.

Poděkovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra:

- [1] Goodridge H.S, Wolf A.J., Underhill D. (2009) β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunol rev*; 230: 38-50.

Prevalencia anti - *S.cerevisiae* manánových (ASCA) protilátok u gastrointestinálnych ochorení.

E. Paulovičová,¹ A. Keleová,² M. Šimko,³ T. Hudáková,⁴

¹Oddelenie imunochémie glykokonjugátov, CHÚ SAV, Bratislava

²Oddelenie klinickej imunológie, KLM, Synlab s.r.o., Bratislava

³Imunoalergologická ambulancia, FNsP, Bratislava – Kramáre

⁴ Biogema as., Košice

Úvod. Patognomický význam komenzálnej saprofytickej kvasinky *S. cerevisiae* sa pozoruje hlavne v súvislosti s imunodeficitnými stavmi (chemoterapia, prolongovaná ATB th , steroidy, post-transplantačná th a i.), d'alej v prípade gastrointestinálnych chorôb (IBD: M.Crohn a ulceratívna kolitída, celiakia). Špecifická anti-*S. cerevisiae* protilátková odpoved' sa zistila aj v prípadoch atopickej dermatitídy a alergickej bronchopulmonálnej mykózy u pekárov, mlynárov a farmárov. Hlavné antigénne induktory špecifickej odpovede reprezentuje glykoprotein gp200 a manán bunkovej steny.

Ciel' práce.

Charakterizovať frekvenciu výskytu pozitivity IgG, IgA and IgM ASCA protilátok u pacientov s celiakiou, Crohnovým ochorením a skupinou (hepatítida, gastritída, črevná malabsorbcia, dyspeptický syndróm). Charakterizovať koreláciu ASCA, AGA a anti-tTG protilátok.

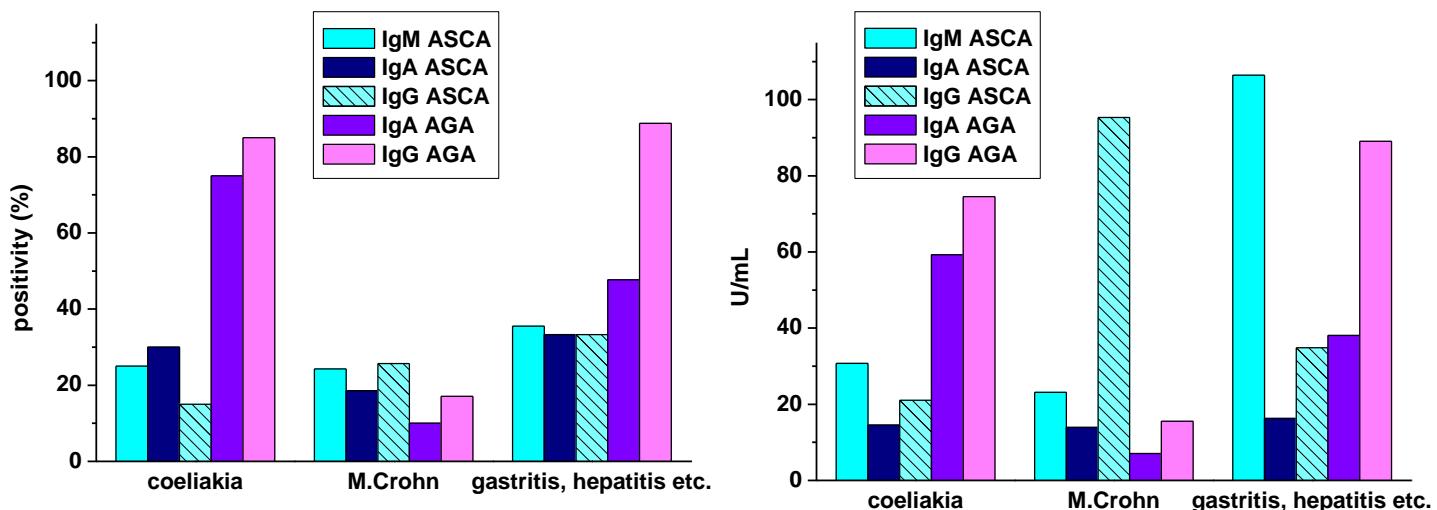
Súbor pacientov. V práci charakterizujeme hladiny sérových anti- *S.cerevisiae* manánových protilátok (ASCA) u pacientov s gastroenteropatiemi ako: črevná malabsorpčia, celiakia, dyspeptický syndróm, hepatopatie, gastritída. V súbore bolo 104 pacientov od 1 do 57 rokov ($25,27 \pm 15,91$): celiakia (20), M. Crohn (67) a 17 s hepatítidou, gastritídou, črevnou malabsorbciou a dyspeptickým syndrómom

Experimentálne metódy.

Humorálna odpoved' sa charakterizovala ELISA pre stanovenie IgG, IgM a IgA ASCA protilátok v sére – nová diagnostická metóda (antigén - manán bunkovej steny *S. cerevisiae* (izolovaný CHÚ SAV, BA).

ELISA pre stanovenie IgG and IgA AGA (Biogema) a ELISA pre IgG-tTG (Aesku.diagnostics)

Výsledky. V serodiagnostike sme sa zamerali na stanovenie IgG a IgA ASCA protilátok, protilátok proti tkanivovej transglutamináze IgG (anti-t TGA) a IgA (AGA) a IgG ä (AGG) anti-gliadínových protilátok. Zistila sa výrazná pozitivita anti-tTGA protilátok-70,2%, AGA protilátok - 83,7%, AGG protilátok- 91,8% a ASCA-IgA 53,2% a ASCA-IgG 62,16%. Vzájomná korelácia pozitivity ASCA IgG a AGG sa pozorovala u 59,46% pacientov a ASCA IgA a AGA u 53,8%. Korelácia pozitivity ASCA IgG a IgG anti-tTGA bola v prípade 36,38% pacientov. Preukázala sa participácia manánových antigénov *S.cerevisiae* v indukcii špecifickej odpovede u gastrointestinálnych ochorení a taktiež pozitívna korelácia ASCA IgA a IgG s AGG a AGA protilátkami. Patognomický význam IgG, IgA a IgM ASCA



Záver. Z uvedeného vyplýva, že monitorovanie sérových anti- ASCA protílátok prispeje k včasnej diagnostike gastroenteropatii a následnému posúdeniu účinnosti terapie.

Literatúra na požiadanie u autora

Podčakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Immunobiological efficacy of *Vibrio cholerae* O1 LPS-derived moieties conjugated to BSA –glucan matrix

E. Paulovičová¹, J. Vráblová¹, P. Farkaš¹, Š. Bezek², S. Bystrický¹

¹ Institute of Chemistry, Dept. Immunochemistry of Glycoconjugates,
Center of Excellence GLYCOMED, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

² Institute of Experimental Pharmacology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Background

LPSs from Gram-negative microorganisms represent conserved microbial structure-pathogen-associated molecular pattern and effective biological response modifier, non-specifically enhancing the host immune system by multiple interactions within innate and adaptive mechanisms.

Complex structure of LPS comprises 3 regions of immunological interest: lipid A, R-polysaccharide or core antigen and somatic-O antigen or O-polysaccharide

Lipid A exerts endotoxic activities, thus detoxification of LPS by lipid A elimination represents the first step in preparation of sub-cellular LPS-derived immunogens as effective inducers of innate and adaptive immunities.

Study aim

The aim of our experimental study was to evaluate immunogenicity of polysaccharidic and glycolipid derivatives from *Vibrio cholerae* LPS, candidates for sub-cellular conjugate vaccine and investigate the influence of different detoxification approaches – acid hydrolyses and base one on their immunological properties.

Methods

BSA-glucan conjugates were prepared from polysaccharide and glycolipid moieties of detoxified LPS isolated from *Vibrio cholerae* O1Ogawa, El Tor.

Female Balb/c mice aged 8-12 weeks were primed and boosted with (1) 4.5µg of an O-SP (after acid hydrolysis of LPS) in glucan- BSA conjugate (conjugate A) containing 78% of polysaccharide; (2) 4.5µg of an O-SP (after base hydrolysis of LPS) in glucan- BSA conjugate (conjugate B) with 88.5 % of polysaccharidic moiety. Conjugates were administrated subcutaneously once at a 2-week intervals.

ELISA method for quantitative determination of specific sera levels of IgG, IgM and IgA anti- LPS antibodies was based on *V.cholerae* O1, Ogawa cell-wall LPS.

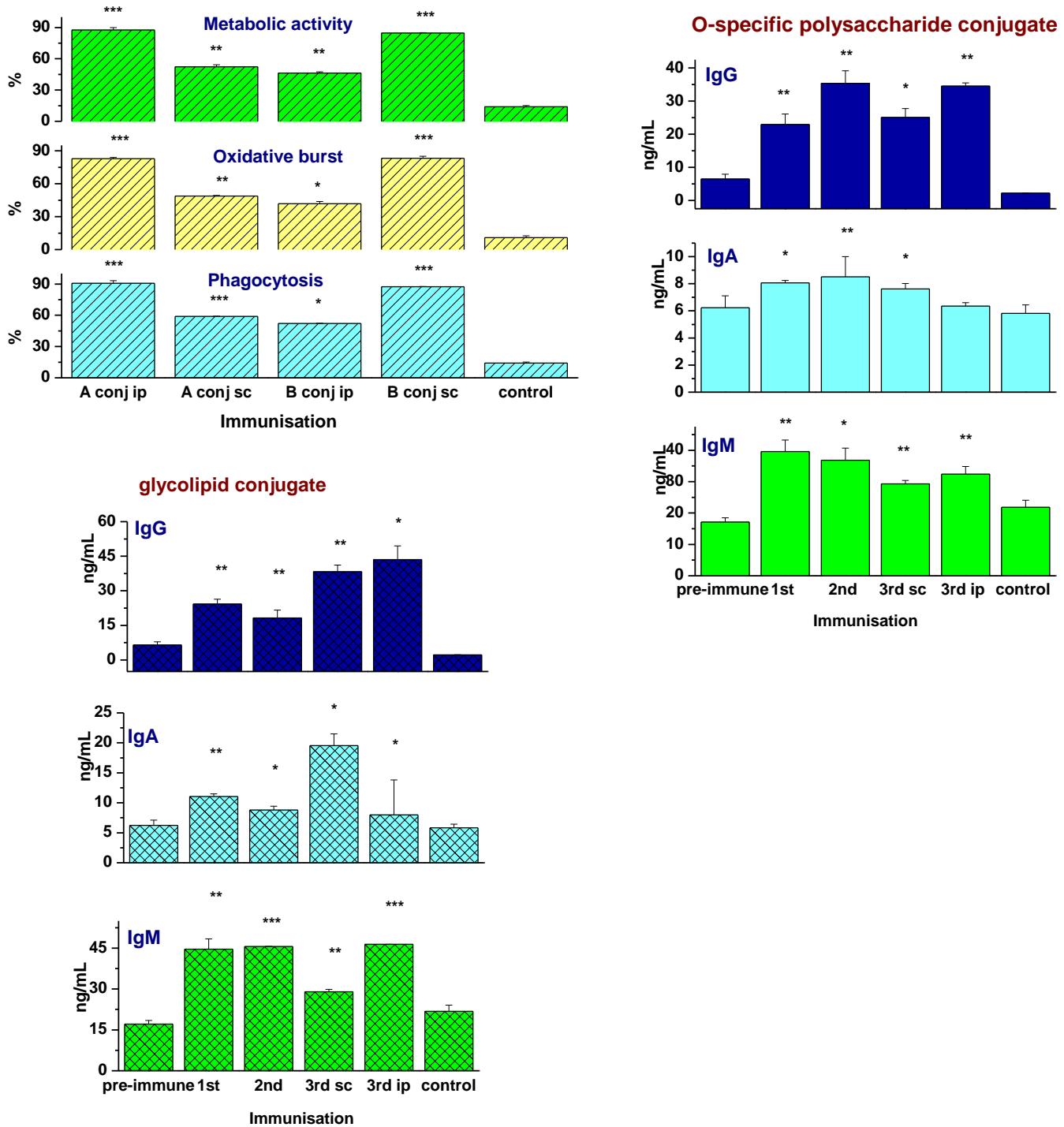
Phagocytosis and intracellular respiratory burst of neutrophils were measured simultaneously by immunocytometry using *S. aureus* FITC conjugated and hydroethidine.

Results and conclusions

Enhancement of specific anti- LPS Ig production.

Effective stimulation of phagocytic activity and respiratory burst by O-specific polysaccharidic conjugate via ip booster immunization.

Effective stimulation of phagocytic activity and respiratory burst by glycolipidic conjugate via sc immunizations.



List of literature available on request.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Mouse peritoneal macrophages cytokine activation by *Vibrio cholerae* LPS derived immunogens.

E.Paulovičová,¹ E. Kováčová,² S.Bystrický¹

¹Slovak Academy of Sciences, Institute of Chemistry,Center for Glycomics, Dept. of Immunochemistry of Glycoconjugates, Bratislava, Slovakia ²Slovak Academy of Sciences, Institute of Virology, Bratislava, Slovakia

Introduction

Lipopolysaccharide (LPS), a component of Gram-negative bacterial outer cell walls, is present in environment (household dust, air pollution, water) assuring that atopic subjects are likely to be exposed to LPS. LPSs of many Gram-negative bacteria are known to exhibit a wide spectrum of endotoxic activities. LPSs from Gram-negative microorganisms represent conserved microbial structure-pathogen-associated molecular pattern and effective biological response modifier, non-specifically enhancing the host immune system by multiple interactions within innate and adaptive mechanisms. Complex structure of LPS includes 3 regions of immunological interest: lipid A, R-polysaccharide or core antigen and somatic-O antigen or O-polysaccharide. As lipid A exerts endotoxic activities, detoxification of LPS by lipid A elimination represents the first step in preparation of sub-cellular LPS-derived immunogens as model inducers of innate immunity. The aim of our experimental study was to evaluate immunogenicity of polysacharidic and glycolipid derivatives from *Vibrio cholerae* LPS, candidates for sub-cellular conjugate vaccine and investigate the influence of detoxification approaches – acid hydrolyses and base one on their immunological properties

The stimulated induction of cytokine secretion (TNF- α , IL-1 α and IL-6) and reactive oxidative species generation was studied on mouse peritoneal macrophage ex vivo model.

Material & Methods

Polysaccharide and glycolipid moieties derived from detoxified LPS were isolated from *Vibrio cholerae* O1 Ogawa, El Tor.Peritoneal mouse (Balb/c) macrophages were prepared by elicitation *via* intraperitoneal injection of 5% thioglycolate broth. Peritoneal exudates cells were collected by lavage. Macrophage stimulation with LPS-derived fractions was performed at 37 0C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide in complete RPMI 1640.

The levels of TNF- α , IL-1 α and IL-6 following challenge were determined in the cell culture supernatants after 3, 6, and 24 h of cultivation, using the flowcytometric fluorescent bead-based multiplex assay (Bender MedSystems, GmbH., Austria).

Total content of reactive oxygen species in the cell culture supernatants after 3, 6, and 24 h of cultivation was assayed by reagent kit Free radicals (Sevapharma Ltd. Czech republic) based on chlorophyllin redox properties.

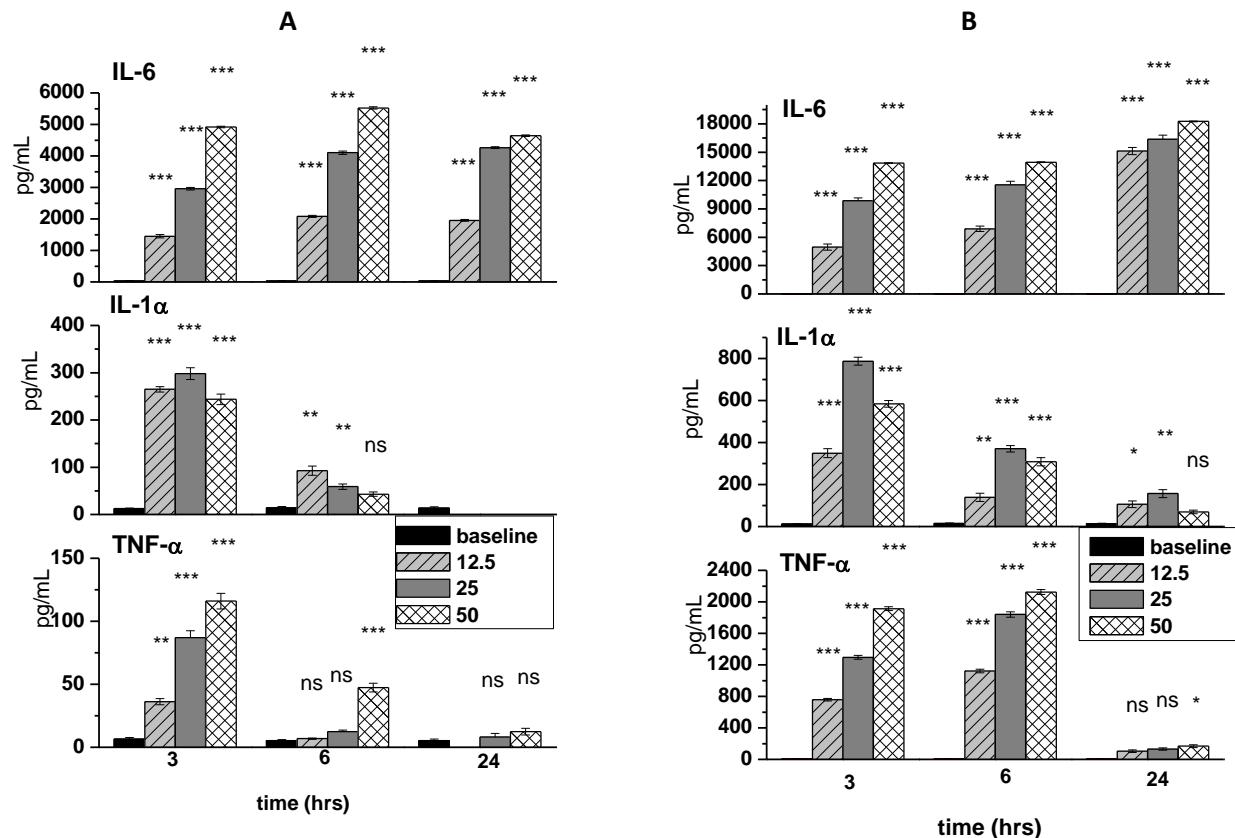
Results & Discussion

The present investigation on detoxified LPS-derived immunogens has resulted in the effective acceleration of ROS and TNF- α , IL-1 α and IL-6 cytokine release by mouse peritoneal macrophages.

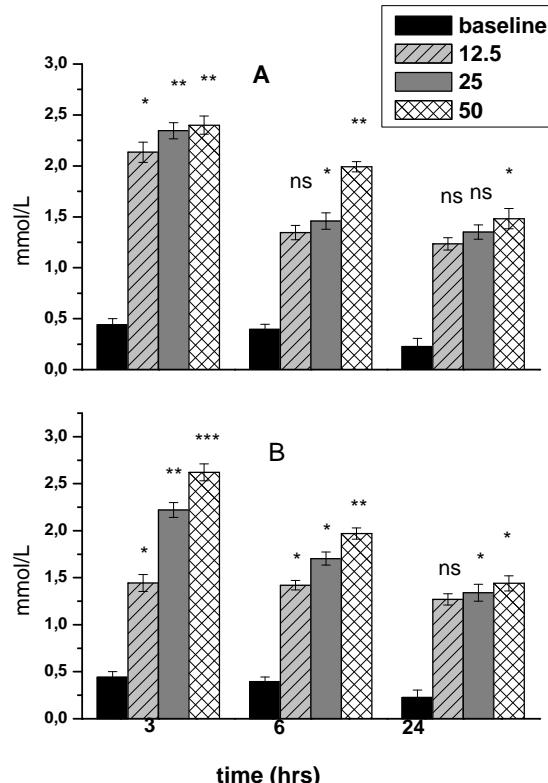
Inflammatory triad TNF- α , IL-1 α and IL-6 vs anti-inflammatory role of IL-6?

The important role of structural arrangement of KDO in immunogenicity of both LPS – derivatives is supposed.

The results indicate the effective immunoenhancing activity of two *Vibrio cholerae* O1 Ogawa, El Tor LPS-derived immunomodulators O-specific polysaccharide and glycolipid and provide supporting evidence for the use of such derivatives in future sub-cellular vaccine development .



Time-dependent cytokine pattern induced by glycolipid moiety (A) derived from base hydrolysis detoxified LPS and O-specific polysaccharide (B) derived from acid hydrolysis detoxified LPS. Thioglycolate - activated murine peritoneal macrophages were stimulated in the range of 12.5-50 μ g. Spontaneous baseline IL-6 and TNF- α secretion of un-stimulated macrophages was below 22 and 15 pg/mL, respectively



Time and concentration dependent release of ROS induced by LPS derived saccharidic moieties: O-specific antigen core attached (A) and glycolipid (B).

List of literature available on request.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) v diagnostike reumatoidnej artritídy

E.Paulovičová,¹ I.Viest²

¹CHÚ SAV, Oddelenie imunochémie glykokonjugátov, Bratislava

²Reumatologická ambulancia, Národný ústav tbc a respiračných chorôb, Bratislava

Úvod

Reumatoidná artritída (RA) je systémové chronické zápalové ochorenie, ktoré býva spojené so stratou hmotnosti, subfebrilitami, anémiou, ako aj s klinickými prejavmi postihnutia rôznych tkanív a orgánov, pričom v popredí klinického obrazu dominujú deformačné zmeny na klboch, ktoré sú sprevádzané lokálnymi zápalovými procesmi klbových štruktúr (v RTG náleze typické klbové erózie). Postihuje mužov aj ženy (pomer 1: 3), v každom veku, s vrcholom v rannej dospelosti a u žien pred menopauzou. Popisuje sa 0,5 – 1,0% postihnutie populácie. Miera deštrukcie klbovej chrupky v degradačnom procese sa posudzuje viacerými biomarkermi: najčastejšie APP a RF.

COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) bol 1.krát popísaný v r.1992 skupinou Heneigard a spol. Molekula COMP je tvorená pentamérom s 5 identickými jednotkami viazanými disulfidovou väzbou, molekulová hmotnosť je 434 kDa. Izolovaný bol primárne z klbovej chrupky, neskôr sa našiel aj v synoviálnej membráne.

Sérové hladiny COMPu priamo úmerne korelujú s mierou deštrukcie klbovej chrupky.

Súbor pacientov a metóda

Do súboru sme zaradili 16 pacientov s prejavmi systémového ochorenia spojivového tkaniva, 87,5% tvorili ženy (vek $61,4 \pm 2,3$ roka), 13,5 % tvorili muži (vek $46,5 \pm 4,2$ roka).

V sérách pacientov sme stanovili skríningovou ELISA metódou celkové antinukleárne protilátky (ANA) resp. extrahovateľné ENA (Kallestad) a metódou dot – blot sme tieto typizovali (Euroimmun), COMP sme kvantifikovali sendvičovým heterogénnym enzymovým imunostanovením (AnaMar).

Výsledky a diskusia

Sérologicky kvantifikované autoprotilátky proti zmesi afinitnou chromatografiou purifikovaných antigénov : históny, Sm, Sm/RNP, SS-A, SS-B a Scl-70 a natívna DNA (ANA skríning) a zmesi Sm,RNP, SS-A, SS-B,Scl-70 a Jo-1

(ENA skríning) boli pozitívne resp. hranične pozitívne u všetkých pacientov v súbore. Typizáciou ANA sa zistila pozitivita autoprotilátok proti dsDNA (84,2%), histónom (49,7%),

SS-A (58,6%), SS-B (18,3%), Sm (6,25%), Jo-1 (6,25%) a nRNP/Sm u 36,4% zo súboru.

Sérové hladiny COMP boli pozitívne u 18,75%, pričom podľa hodnotenia (hodnoty COMP nad 15 U/l) sa jednalo o aktívnu formu reumatiodnej artritídy.

Kazuistika

B.A.,1961

OA: 5 mesiacov trvajúca artritída v oblasti drobných kĺbov ručných a periartritída v oblasti pravého ramena.

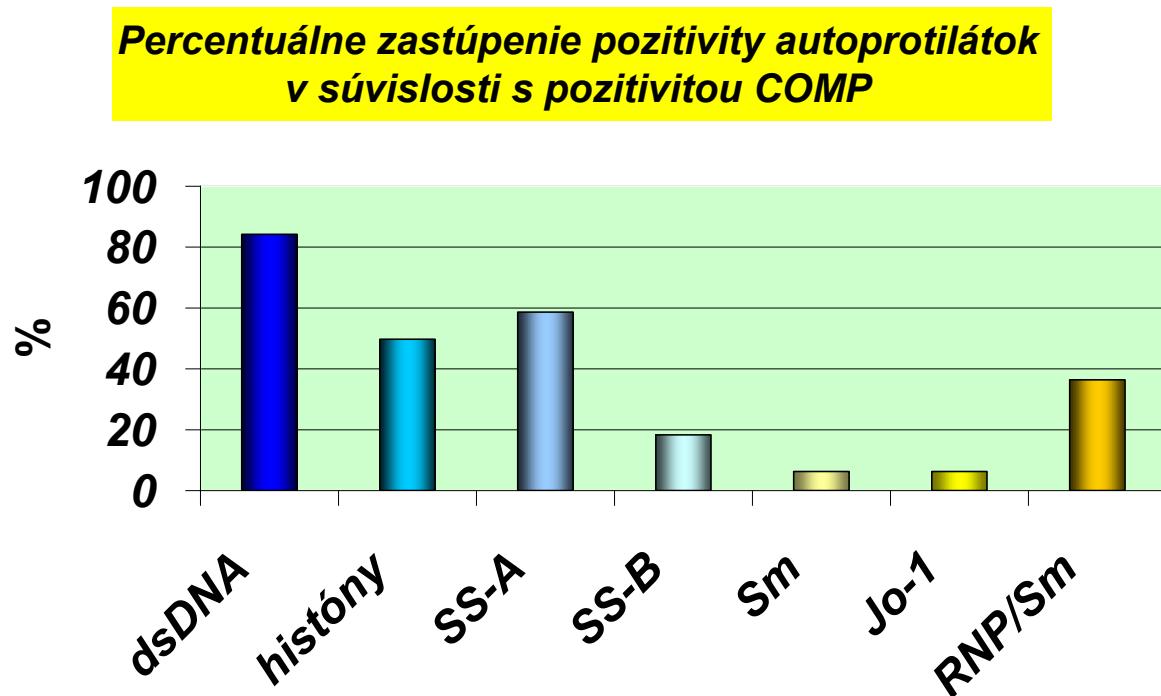
Laboratórny nález: vysoký titer RF (1128 IU/ml), prítomná humorálna aktivita (FW, CRP), ANA skríning pozitívny, ENA skríning pozitívny, ANA typizácia: anti SS-A +++,

COMP 19,5 U/l , RTG nález: zatiaľ nález cystoidných prejasnení

Doterajší diagnostický záver : Reumatoïdná Artritída

Záver

Signifikantný význam COMPu sa potvrdil v diagnostike RA, v monitorovaní humorálnej aktivity ochorenia ako aj v prognóze vývoja RTG nálezu a v monitorovaní účinnej terapie.



Literatúra dostupná na vyžiadanie u autorov.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Immunologically active *Candida glabrata* cell wall mannan.

Paulovičová L¹., Paulovičová E¹., Pericolini E.², Gabrielli E², Vecchiarelli A²

¹Slovak Academy of Sciences, Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Center of excellence

Glycomed, Dept. Immunochemistry of Glycoconjugates, Bratislava, Slovakia

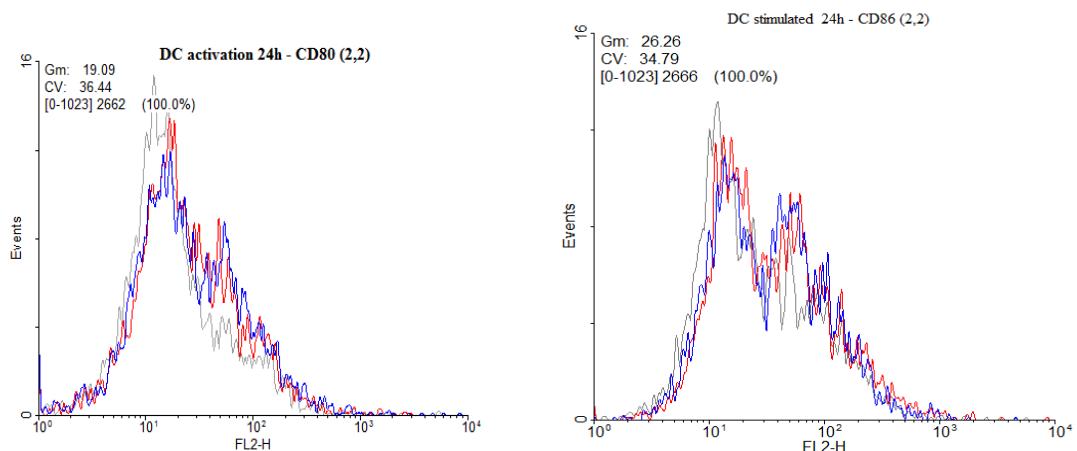
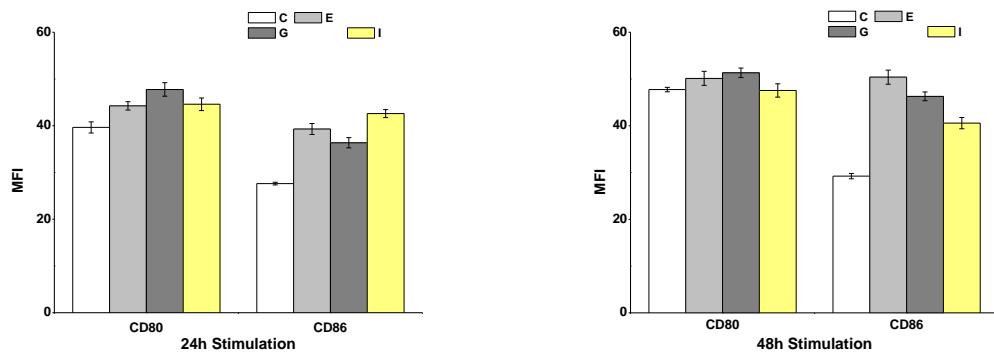
²Microbiology Section, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy

Introduction. The yeasts of *Candida* spp. are opportunistic pathogens, part of the human commensal flora that causes infections mainly in immunocompromised individuals with a high morbidity and mortality levels. *C. glabrata* is one of the most common causes of candidiasis following *C. albicans*. *C. glabrata* infections can be mucosal or systemic and are frequent in immunocompromised patients or those with diabetes mellitus. *C. glabrata* is of special importance because of a recent increase in its frequency and its innately reduced susceptibility to antifungal agents, specifically the azoles. The immunomodulation of fungal infections depends on the specific recognition of cell-wall antigens, representing the pathogen associated molecular patterns by immunocompetent cells. These antigens could be able to induce proliferation and activation of immune system effector cells. Mannan polysaccharide is exposed at the most external layer of the cell wall and is involved in several types of interactions of fungal cells with host immune system. Until yet, the role of mannan on immune system modulation is not sufficiently described. Investigation of mannan immunomodulatory functions could be considered as an important part of antifungal protective immunity research. The model of dendritic cells (DCs) represents a promising target for immunotherapy interventions and vaccine development. DCs increase an innate or specific response to fungi by producing inflammatory mediators, they are uniquely appropriate for decoding the fungus-associated information and next translation into a qualitatively different T helper responses.

Material & Methods.

Yeast strain *C. glabrata* CCY 26-20-1 (Culture Collection of Yeast, Institute of Chemistry of Slovak Academy of Science, Bratislava, Slovakia) was cultured on semi-synthetic 2 % glucose medium at 28°C for 4 days. Cellular mannan was extracted by autoclaving in 0.2 mol/l NaCl (120°C, 700 kPa) for 10 minutes and purified using precipitation with Fehling's reagent. Experimental animals: Mice (CD1 mice, female, 4 - 6 weeks of age) were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Calco, Lecco, Italy). Cell separation: CD11c+ DC were separated from spleens of CD1 mice using CD11c (N418) mAbs - conjugated MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany), followed by magnetic separation according to the manufacturer's instructions. Cell stimulation and flow cytometry analysis

For analysis of CD80 and CD86 expression, purified splenic CD11c+ DCs (105/ml) were stimulated for 24 or 48 h with 10 µg/ml Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS), 400 µg/ml and 800 µg/ml of mannan *C. glabrata*. After stimulation, cells were harvested and incubated for 30 min at 4°C with phycoerythrin (PE) labelled monoclonal antibodies to CD80 and CD86 (Antigenix America Inc., USA). After incubation, cells were analyzed using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Control staining of cells with irrelevant antibodies was used to obtain background fluorescence values. Data are expressed as mean of fluorescence intensity (MFI) of labelled cells. Results shown as histograms are from one representative experiment out of three with similar results.



Conclusions.

Antigen presentation and immune recognition are two critical events in the generation of effective immune responses to microbial pathogens. The generally accepted model of T-cell activation requires two signals. The major costimulatory signal appears to be provided by the B7 molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on the APC. Cell wall components of fungi involved in induction of host immune response are predominantly proteins and glycoproteins. In this study we analyze the interaction of mannan from *C. glabrata* with dendritic cells and demonstrate that both stimulates DCs and induces increase of costimulatory molecules CD80 and CD86 expression. We observed, that *C. glabrata* mannan is able to induce activation of DCs and to increase the expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86. Stimulation of mouse spenocytes with mannan induced proliferation in concentration dependent manner.

List of literature available on request.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Immunobiological properties of *Candida* cell wall derived synthetically prepared oligosaccharides-protein conjugate.

L. Paulovičová¹, E. Paulovičová¹, E. Pericolini², E. Gabrielli², A. A. Karelín³, Y. E. Tsvetkov³, N. E. Nifantiev³, A. Vecchiarelli²

¹Institute of Chemistry, Centre of Excellence GLYCOMED, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

²Microbiology Section, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy

³N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Introduction. Yeasts of *Candida* spp. are a part of the normal microbial flora of mucosal surfaces and alimentary tract of most healthy subjects. However, this fungus is able to cause severe mucosal and life-threatening systemic infections in immunocompromised patients. The host response to the fungal infection depends on the antigenic determinants recognition and also on effector cells activation. The majority of fungi are detected and destroyed within hours by innate defence mechanisms. Adaptive immunity is mediated by expression of co-stimulatory molecules and production of chemokines and cytokines by most cells of the innate immune system, but most importantly by dendritic cells that are currently believed to be the conductors of this complex cooperation. Mannan polysaccharide is exposed at the most external layer of the cell wall and is involved in several types of interactions of fungal cells with host immune system. Mannan consists of backbone with α -1,6-bonds and mannoside side chains of varying length, containing α -1,2, α -1,3 and β -1,2 bound types. To identify relevant protective antigenic structure of *Candida* cell wall mannan, it is appropriate to investigated modulation of immune responses induced by different mannans and mannan-derived mannooligosaccharide structures. For this purpose we analysed immunomodulatory properties of exactly defined synthetically prepared mannan-derived oligomannoside - protein conjugate. The model of dendritic cells is a promising tool to study immunomodulatory interventions throughout the vaccine development. Dendritic cells are able to activate T cells through expression of co-stimulatory molecules and produce cytokines that will regulate the adaptive immune response. We find out, that mannan-derived heptamannoooligosaccharide – BSA conjugate is able to induce activation of DCs and increase the expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86. Dendritic cells are uniquely adept at decoding the fungus-associated information and translate it in qualitatively different T helper responses. The need for most fungi is a stable host-parasite interaction that is achieved upon the implicit agreement that the elicited immune response be strong enough to allow host survival without pathogen elimination and to establish commensalism/persistence without excessive pro-inflammatory pathology. Understanding how innate immune responses are activated will probably result in the construction of better immunomodulatory strategies that are able to induce protective immunity to fungi.

Material and methods. Oligosaccharide-conjugate preparation

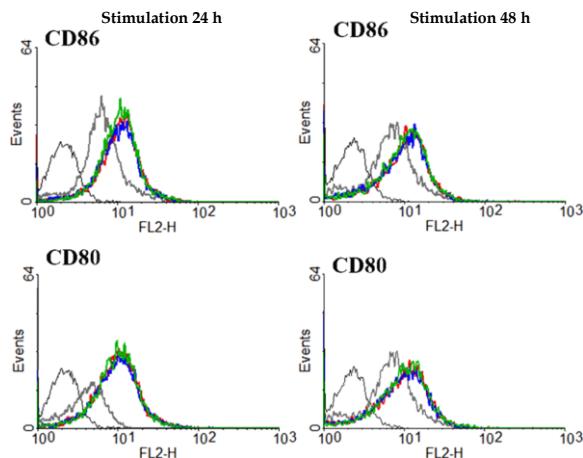
Conjugation of synthetic heptasaccharide ligand was performed by squarate method. At first step, its reaction with diethyl squarate at pH 7 gave corresponding monosubstituted adduct. Its subsequent coupling with BSA at pH 9 resulted in the formation of conjugate. According to MALDI TOF mass spectrometry conjugate contained on the average 4 heptasaccharide residues per one BSA molecule.

Experimental animals. Mice (CD1 mice, female, 4 - 6 weeks of age) were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Calco, Lecco, Italy).

Cell separation. CD11c+ DC were separated from spleens of CD1 mice using CD11c (N418) mAbs - conjugated MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany), followed by magnetic separation according to the manufacturer's instructions.

Cell stimulation and flow cytometry analysis. For analysis of CD80 and CD86 expression, purified splenic CD11c+ DCs (105/ml) were stimulated for 24 or 48 h with 10 µg/ml *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), 50 µg/ml and 100 µg/ml of conjugate. After stimulation, cells were harvested and incubated for 30 min at 4°C with phycoerythrin (PE) labelled monoclonal antibodies to CD80 and CD86 (Antigenix America Inc., USA). After incubation, cells were analyzed using a FACScan flow cytofluorometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Control staining of cells with irrelevant antibodies was used to obtain background fluorescence values. Data are expressed as mean of fluorescence intensity (MFI) of labelled cells. Results shown as histograms are from one representative experiment out of three with similar results.

Results and Discussion



Expression of CD80 and CD86 upon dendritic cell stimulation

DCs were stimulated for 24 h and 48 h with 10 µg/ml LPS (red line), and 100 µg/ml M7-BSA conjugate (green line). As a negative control DCs cultured without stimulants (gray line) were used. Control staining of cells with irrelevant antibodies was used to obtain background fluorescence values (black line).

Two critical events in the generation of effective immune responses to microbial pathogens represent antigen presentation and immune recognition. Two main signals are required in generally accepted model of T-cell activation. The first signal is the occupancy of the T-cell receptor (TCR) by a complex of the antigenic peptide and major histocompatibility complex (MHC) molecules on the antigen presenting cell surface. The second signal results from binding costimulatory ligand molecule on the APC surface to a receptor on the T-cell surface. The major costimulatory signal appears to be provided by the B7 molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on the APC. Reported results provide new information about the possible role of

the mannan derived oligosaccharide – protein conjugates in DCs activation and, as a consequence, antigen presentation process.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Serodiagnostics of vulvovaginal candidosis in atopic subjects. Engagement of *Candida albicans* complement receptor 3-related protein.

E.Paulovičová,¹ M.Hrubiško,² P.Kertys,³H.Bujdáková⁴

¹Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Center of Excellence Glycomed, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

²Oncology Institute of St. Elisabeth, Department of Clinical Immunology and Allergy, Bratislava, Slovakia

³ Faculty Hospital of Comenius University, Department of Clinical Immunology and Allergy, Bratislava, Slovakia

⁴ Comenius University, Bratislava, Slovakia, Faculty of Natural Sciences,
Department of Microbiology and Virology,

Introduction. *Candida albicans*, a dimorphic fungus, is a component of the normal microflora of skin, mucosa and gastrointestinal tract of the healthy host. Commensalisms can be easily turned into mucosal candidiasis or deep-seated candidiasis in immunocompromised patients. In the last few decades the incidence of fungal infections caused by *Candida albicans* and other related human opportunistic yeast species has increased dramatically due to the rise in the number of immunocompromised patients. To become invasive, *Candida* must follow three-stage mechanism: (i) adhesion to host constituents and proteinase secretion (ii) blastospore germination, mycelium or hyphae development and (iii) epithelium invasion. The characteristics linked to phenotype switching, dimorphism, adhesion, and enzyme secretion could explain the mechanism by which previously commensal fungus can become an opportunistic pathogen, switch between saprophytic and pathogenic behaviour. By operating a dimorphic transition from blastospore to the filamentous stage, *C. albicans* increases in adhesive properties and proteinase secretion. Some adhesins binding complement conversion products C3d and iC3b are only expressed on the hyphae or germ-tube forms of *C. albicans*. CR3 is a heterodimeric glycoprotein (gp165, 95) expressed on the plasma membrane of neutrophils, monocytes, macrophages and NK- cells. It is a member of the $\beta 2$ integrin family that also includes lymphocyte function antigen-1 (LFA-1; CD11a/CD18) and protein 150, 95 (p150,95; CD11c/CD18), each of which consists of unique (but homologous) α (CD11a, b, and c) subunits non-covalently associated with a common β (CD18) subunit. Unique to CR3 are two separate binding sites, one is carbohydrate-binding site for glucomannans and the second site is for the iC3b fragment of C3. The glucomannan binding site is located within the C terminus of CD11b, whereas iC3b binding site belongs to the N-terminal I-domain of the CD11b subunit of CR3.

Vaginal candidosis affects approximately 75 % of all women at least once during their lifetime and approximately half of them will suffer a second candidal vulvovaginitis event and approximately 5 % of cases will develop a recurrent candidal vulvovaginitis, showing frequent and refractory episodes.

Patients.

Seventy-two female allergic subjects (34.6 ± 12.2 yrs) with culture documented recurrent candida vulvovaginitis were enrolled in the study. Primary exclusion criteria were recent or ongoing ATB or immunosuppressive therapy. *Candida* spp. isolated from vaginal (92.61%) or cervical (7.39%) swabs undergo typing and identification (HPL Laboratories, Bratislava, Slovakia). Skin prick test (SPT), including *Candida albicans* allergen, (Alyostal®

Stallergenes) was done on the patients' forearm according to the international and national guidelines.

Material. The sera samples were stored at -70 °C and analysed retrospectively and results had no influence on therapeutic decisions. Sera samples were collected also from healthy blood donors ($n = 100$, National Blood Service, Slovak Republik). The study was approved by the Local Ethical committees of Oncology Institute of St. Elisabeth and Faculty Hospital of Comenius University in Bratislava and written informed consent in accordance with the principles of the Helsinki Declaration of 1975 was obtained from all patients.

The synthetic peptide DINGGGATLPQAL corresponding to the 13 amino-acids (KL Ross Petersen, ApS, Chemical Research and development Laboratory, Denmark) was designed on the CR3-RP sequence already published by Bujdáková et al., 2008. Peptide was synthesized as white powder with high purity (HPLC, $\geq 95\%$).

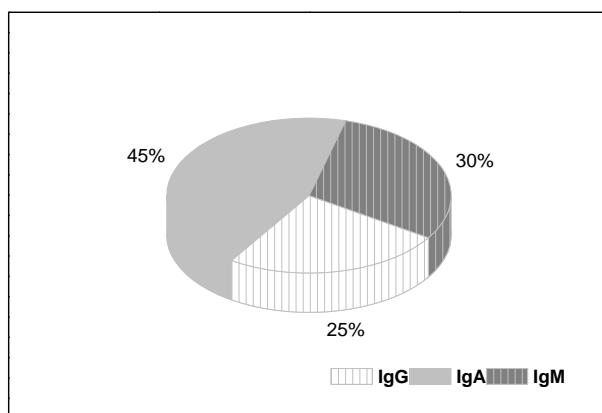
ELISA assay for CR3-RP IgG, IgA and IgM determination.

Enzyme-linked immunosorbent assay has been developed for the determination of CR3-RP specific IgG, IgA and IgM antibodies by modification of ELISA anti-Candida II based on *Candida albicans* cell wall mannan and β -glucan antigens (Biogema, Slovakia). Synthetically prepared CR3-RP in sodium bicarbonate-sodium carbonate buffer pH 9.6 was applied onto Immulon 4HBX microplates (Dynex, USA). Sera samples were examined for CR3-RP specific IgG, IgA and IgM antibodies with peroxidase labelled anti-human IgA, IgG and IgM antibodies (KPL, USA). According to the absence of international standards the appropriate concentrations of different Ig isotypic antibodies were evaluated based on calibration curve using internal standard i.e. pool of positive sera with established value of 100 arbitrary units (U). The cut-off values were calculated according to blood donors' IgG/IgM/IgA anti-CR3-RP sera values (average + 3 s.d.).

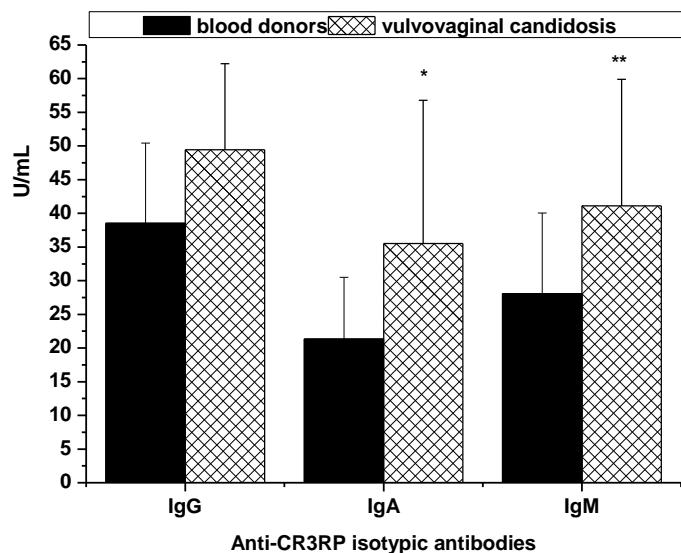
Counter immunoelectrosyneresis

The qualitative detection of anti-*Candida* antibodies and anti-CR3-RP antibodies was performed via counter immunoelectrosyneresis of patient sera using *C. albicans* metabolic and somatic antigens (Bio-Rad Labs., USA) as standard candida antigens and CR3-RP antigen.

Results



Frequency of anti-CR3RP specific antibodies positivity in study population.



Distribution of sera levels of anti-CR3RP specific antibodies in blood donors and subjects with vulvovaginal candidosis.

Conclusions. In vitro quantification of specific anti-*Candida albicans* antibodies based on synthetically prepared complement receptor 3-related protein (CR3-RP) mimicking structure of native complement receptor 3 in cohort of 72 atopic patients with culture documented humoral response against *Candida* CR3-RP, mostly significant being IgM and IgA isotypic antibodies (45% and 30% positive results, respectively). The quantitative evaluation of anti-CR3RP isotypic antibodies was positively confronted with results of commercial ELISA anti-*Candida albicans* diagnostics based on *Candida albicans* cell-wall mannan and β -glucan antigens, the most significant correlation being observed with IgM ($r = 0.478$) and IgA ($r = 0.376$) isotypes. The immunogenicity of CR3RP antigen was evaluated by the mean of counterimmunoelectrophoresis. Synthetically prepared CR3-RP reflecting the candida cell-wall derived moiety represents an immunogenic tool not only for *Candida* serodiagnosis of but also for follow up of targeted therapy and as anti-candida vaccine candidate.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Imunomodulačné účinky kandidového glukomanánu.

E.Paulovičová,¹M.Pajtinka,¹ P.Kertys,² M.Hrubiško,³ T. Hudáková⁴

¹CHÚ SAV, , Bratislava ,²OKIA FN pracovisko Staré Mesto, Bratislava,³OKIA OUSA Bratislava, ⁴Biogema, Košice

Úvod. Glykány tvoria hlavné štruktúrne komponenty bunkových stien kvasiniek, ktoré predstavujú cca 90% bunkovej steny. Glykány predstavujú účinné imunomodulátory, ich imunobiologický potenciál je výrazne podmienený predovšetkým štruktúrou, konformáciou a vetvením. Hlavné glykány predstavujú: (i) β -1 ,3-D-glukány a (ii) β -1,6-D-glukány (iii) chitín a (iv) mannoproteíny. V bunkovej stene *Candida utilis* sa nedávno opísal prirodzene sa vyskytujúci β -glukomanoproteínový komplex. Glukomanán *Candida utilis* je funkčne i štrukturálne veľmi podobný manánom iných *Candida* a *Saccharomyces sp.* vzhľadom na ich výrazne rozvetvenú štruktúru, glykozidické väzby, vysoký obsah z manózy; napriek tomu imunochemické štúdie poukazujú na minimálnu skríženú reaktivitu. Imunomodulačné účinky glukomanánu zahrňujú antimutagénne, antiklastogénne, bioprotektívne a aj fotoprotektívne (supresia UVB indukowanej apopózy keratinocytov) a anti-radikálové účinky. Bola popísaná aj indukcia chemiluminiscencie neutrofilov a oxidatívneho vzplanutia, ďalej indukcia cytokínov a chemokínov. Glukomanán účinne inhiboval adhezínu a blokoval adhéziu baktérií na epitely GITu. Taktiež je významný modifikátor biologickej odpovede (biological response modifier).

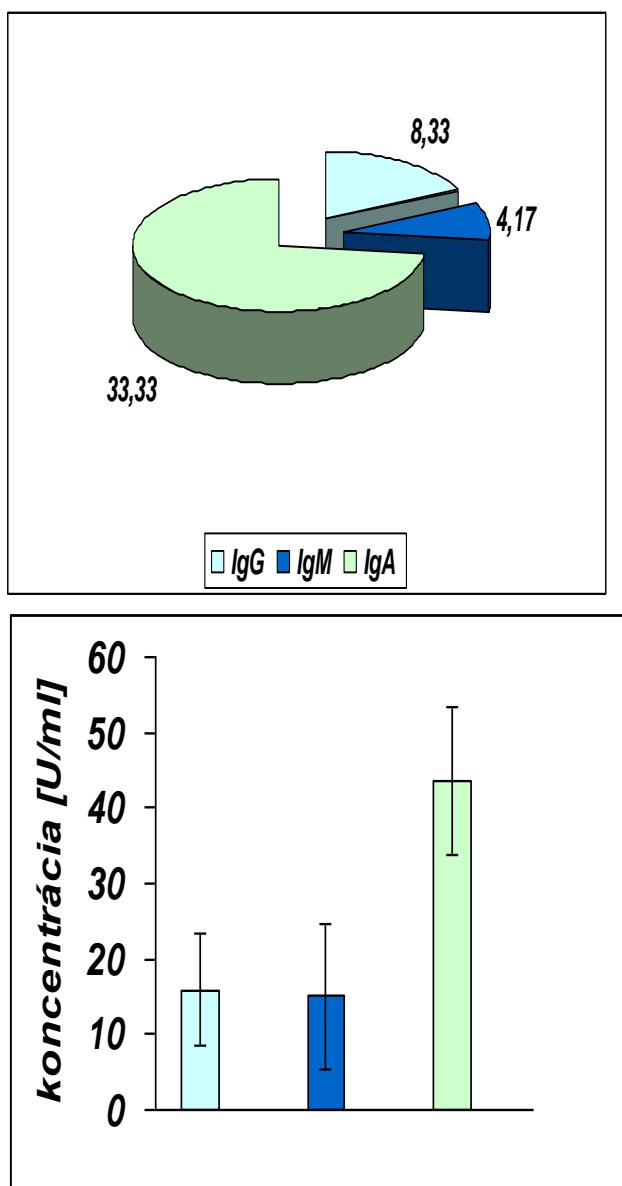
Diagnostický význam anti-glukomanánových protilátok pri kandidových ochoreniach sa zatiaľ netestoval.

Súbor pacientov a metódy.

V súbore 25 (32.2 ± 22.8 r), atopických pacientiek s rekurentnou kandidovou vulvovaginitídou, s pozitívnymi prick testmi na inhalačné alergény (93%) a na *Candida albicans* (74%) sme stanovili sérové hladiny glukomanán-špecifických Ig izotypov vývojovou metódou heterogénneho enzymového imusorbentového stanovenia ELISA. Fyziologický rozsah sérových anti-glukomanánových protilátok sa deklaroval na základe hodnôt zistených u darcov krvi.

Glukomanán bol izolovaný z *Candida utilis* CCY 29-38-18 (Zbierka kultúr kvasiniek, CHÚ SAV) extrakciou 2% KOH a následnou purifikáciou Fehlingovým činidlom z izolovaných celulárnych glykoproteínov.

Výsledky.



Koncentračný rozsah anti-glukomanánových protilátok a idistribucia špecifických Ig izotypov v súbore pacientiek s vulvovaginitídou.

Závery

Najvyššia pozitivita (33.3%) sa zistila v prípade IgA izotypu, IgG a IgM izotypy boli pozitívne len u 8.33 resp 4.17% súboru. Výsledky poukazujú na patognomický význam predovšetkým antigénšpecifického izotypu IgA v súvislosti s postihnutím slizníc v prípade candidovej vulvovaginitídy.

Experimentálne výsledky poukazujú na možnosť rozšírenia spektra fungálnych antigénov – imunogénnych glykánov v *in vitro* diagnostike mykotických vulvovaginitíd. Je reálny predpoklad, že kvantifikácia sérologickej antigénšpecifickej IgG, IgA a IgM odpovede pri kandidovej vulvovaginitíde rozšíri možnosť monitorovania účinnosti antimykotickej terapie.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excellentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo

zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, Centrum excelentnosti - Glycomed a Agentúry pre vedu a výskum (VEGA 2/0040/10).

Glucotoxicity in Pancreatic β Cells: Role of Protein Modifications and Proteasome

Lucia Račková^a, Tobias Jung^b, Štefan Bezek^a, Tilman Grune^b

^aInstitute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

^bInstitute of Nutrition, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany

ABSTRACT

INTRODUCTION: Oxidative stress has been widely considered as a key player in the injurious effects of hyperglycemia to various tissues, including pancreatic β cells. Besides retina, kidney, neurons and vascular tissue, insulin producing β cells represent one of the major targets of diabetic complications caused by a chronically elevated glucose level. As the hyperglycemia in diabetes becomes chronic, glucose that normally serves for pancreatic β cells as fuel and signal takes on the darker role of a toxin. Excessive formation of oxygen radicals resulting from accelerated glucose metabolism leading to cell dysfunction and apoptosis is a well-established proposition explaining glucose toxicity in these cells.

METHODS: Intracellular oxidants generation along with cell viability, activity of 20S/26S proteasome (a proteolytic system involved in defective proteins degradation) and post-translational protein modifications (carbonylation and glycation) were assessed in INS-1E β cells under high glucose (HG) conditions by using fluorometric and colorimetric assays, immunostaining analyses and application of fluorescent microscopy.

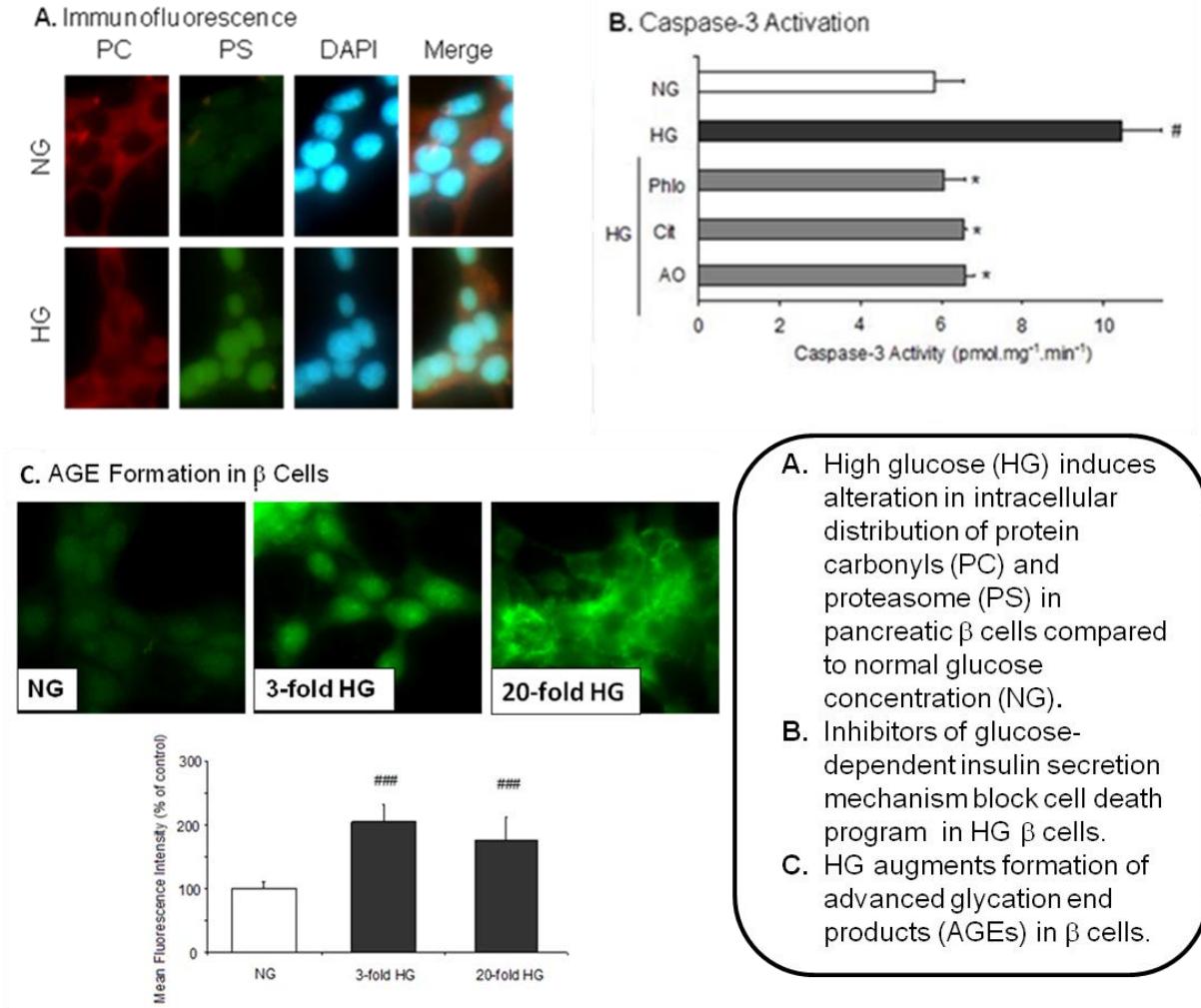
RESULTS AND DISCUSSION: HG caused a significant boost in intracellular oxidants generation, an increase of levels of protein carbonyls (PCs) and advanced glycation end products (AGEs) along with 26S proteasome inhibition. This was also followed by the alteration in subcellular distribution of both oxidized proteins and proteasome. The glucose elevation caused a mild rise of PCs in the nuclear part of the cells. Furthermore, HG augmented the fluorescent intensity of proteasome labelling clearly within nuclear region of the INS-1E β cells. In proportion to this observation, available data point to the glycation-dependent oxidative stress in the nucleus of β cells leading to deterioration of insulin secretion function. Moreover, glycolysis suppressors inhibited caspase 3 activation in HG treated cells along with reducing the levels of oxidative stress.

CONCLUSION: These results highlight the role of enhanced glucose metabolism in generation of oxidative stress and related toxic effect of hyperglycemia to pancreatic β cells in diabetes. On the other hand, proteasomal system appears to be a defence mechanism to compensate injurious effects of high glucose, whereas lethal effects of HG may be associated with its failure.

HIGHLIGHTS

- High glucose alters distribution of protein carbonyls and proteasome in pancreatic β cells.
- Inhibitors of glucose metabolism block cell death program activation in HG β cells.
- Inhibitors of glucose metabolism suppress oxidative stress in HG β cells.

GRAPHICAL ABSTRACT



Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Tunikamycín znižuje glykozyláciu P-glykoproteínu bez ovplyvnenia jeho transportnej aktivity v leukemických bunkách

L1210

¹Šereš M., ²Cholujová D., ¹Bubenčíková T., ¹Breier A., ¹Sulová Z.

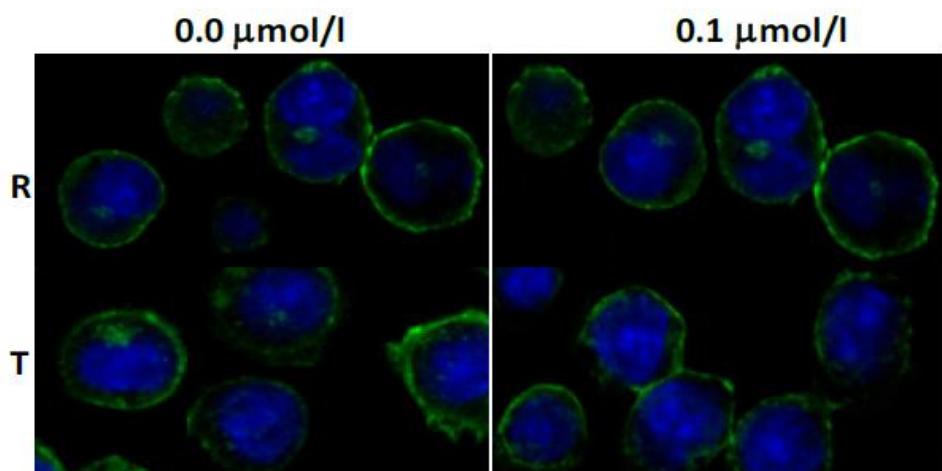
¹Ústav molekulárnej fyziologie a genetiky SAV, Bratislava, Slovensko

²Ústav experimentálnej onkологии SAV, Bratislava, Slovensko

Multidrug rezistencia (MDR) umožňuje bunkám stať sa rezistentnými voči toxickejmu vplyvu rôznych látok, líšiacich sa od seba ako štruktúrou, tak i funkciou. P-glykoproteín (P-gp) je ATP závislá transportná pumpa, ktorá keď je lokalizovaná v plazmatickej membráne buniek, transportuje látky z intracelulárneho do extracelulárneho prostredia, a tak zabezpečuje *multidrug* rezistenciu v neoplastickejch bunkách. P-gp je 140 kDa polypeptid, po glykozylácii je jeho relatívna molekulárna hmotnosť až okolo 170 kDa.

Našim experimentálnym modelom sú P-gp negatívne myšie leukemické bunky L1210 (S), z nich sme získali P-gp pozitívne bunky bud' postupnou dlhodobou adaptáciou na cytostatikum vinkristín (R) alebo transfekciou génom pre ľudský P-gp (T). Expresia P-gp v membránach R a T buniek indukuje výrazné zmeny v zložení sacharidov v porovnaní so S bunkami (Sulová a kol., 2010).

V tejto práci sme sledovali vplyv tunikamycínu na glykozyláciu, transportnú aktivitu a bunkovú lokalizáciu P-gp v R a T bunkách. Kultivácia buniek s tunikamycínom (inhibítorm N-glykozylácie) ovplyvnila viabilitu buniek koncentračne závislým spôsobom, avšak v R a T bunkách vo výrazne menšej miere ako v S bunkách. Tunikamycín inhiboval N-glykozyláciu P-glykoproteínu v R a T bunkách. Zaujímavé bolo, že kultivácia buniek s tunikamycínom neovplyvnila lokalizáciu P-gp v plazmatickej membráne buniek (Obr. 1) a ani jeho transportnú aktivitu.



Obr.1- Imunofluorescenčná vizualizácia P-glykoproteínu (zelená) pomocou protílátky c 219 a sekundárnej protílátky konjugovanej s FITC v R a T bunkách po kultivácii buniek bez (0) alebo s tunikamycínom (0.1 μmol/l). Jadrá buniek sú farbené DAPI (modrá).

Zistili sme, že v P-gp pozitívnych L1210 bunkách, nezávisle od spôsobu, akým k expresii P-gp došlo (selekcia s liečivom alebo transfekcia génom pre P-gp), tunicamycín indukuje inhibíciu N-glykozylácie P-glykoproteínu bez ovplyvnenia jeho funkcie ako transportnej ATP-ázy v plazmatickej membráne buniek.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Lit.: Sulová Z. a kol. The presence of P-glycoprotein in L1210 cells directly induces down-regulation of cell surface saccharide targets of Concanavalin A. Anticancer Res 30: 3661-3668. 2010.

Identifikácia α -galaktozidázy *Cryptococcus neoformans*

Csilla Mészárosová, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová

Cryptococcus neoformans, α -galaktozidáza, primárna štruktúra, Uniprot

Úvod

Kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi všeobecne rozšírené patogény. Ich najdôležitejším virulentným faktorom je polysacharidová kapsula, ktorá ich chráni pred nepriaznivými podmienkami prostredia vrátane imunitnej odpovede napadnutého organizmu [Pirofski a Casadevall, 1996]. V tejto súvislosti sa uvažuje aj o podiele povrchových glykozidáz týchto kvasiniek na premenách kapsulárnych polysacharidov a tým aj na virulentnosti jednotlivých kmeňov. Patogenita rodu *Cryptococcus* viedla k určeniu kompletného proteómu hlavného zástupcu tohto rodu *C. neoformans* [Loftus a kol. 2005]. Tento pomáha pri identifikácii proteínov, ktoré sa zúčastňujú na virulentnosti ďalších kmeňov tohto rodu. Problémom zostáva nedostatočná charakterizácia resp. absencia biochemickej charakterizácie väčšiny proteínov, ktorých primárne štruktúry sa z genómu odvodili. Medzi takéto prípady patrí aj α -galaktozidáza, ktorá bola naopak dokázaná na povrchu *C. neoformans* na úrovni enzymovej aktivity (Maceková a kol., 2006), ale na proteínovej úrovni identifikovaná nebola.

Materiál a metódy

Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>

www.uniprot.org

<http://www.proteinmodelportal.org>

Výsledky a diskusia

Identifikácia α -galaktozidázy v rámci proteómu *C. neoformans* bola pomerne komplikovaná, keďže napriek zverejnenému kompletnému genómu tohto mikroorganizmu, takýto enzym v databázach uvedený neboli (Loftus et al. 2005). Napriek tomu Maceková a kol. (2006) popísali prítomnosť tohto enzýmu na povrchu tejto kvasinky na základe nameranej aktivity.

α -Galaktozidáza (α -D-galaktozid galaktohydroláza, E.C. 3.2.1.22) patrí do triedy hydroláz a podtryedy glykozidhydroláz (GH). α -Galaktozidázy patria do GH rodín 4, 27, 36, 57, 97 a 110, ale α -galaktozidázy kvasiniek boli zatiaľ zaradené len do GH 27 (*Saccharomyces cerevisiae*). Jedinými proteínmi *C. neoformans*, ktoré patria do spomenutých rodín, je Q5K805 a Q55IG4 označené ako "putative uncharacterized proteins" *C. neoformans* (Loftus et al. 2005). Pod týmito databázovými číslami sa skrývajú identické primárne štruktúry patriace do GH 36. Podobnosť v rámci GH 27 a 36 (obidve rodiny patria do rodu GH-D) bola popísaná Comfort a kol. (2007). Tento rod je charakterizovaný tým, že v priebehu katalýzy ostáva zachovaná konfigurácia sacharidu, katalytický nukleofil/zásada a donor protónu sú reprezentované asparagínom a stav 3D štruktúry je $(\beta/\alpha)_8$

(Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>; Cantarel a kol., 2009). GH 27 a GH 36 rodiny zahŕňajú enzýmy, ktoré majú aj hydrolytickú aj transglykozylačnú aktivitu. Pre Q5K805 a Q55IG4 bola na základe ich štruktúry predpovedaná rafinózosyntázová aktivita, ktorou sa môžu vyznačovať aj α -galaktozidázy. Porovnanie so známou štruktúrou α -galaktozidázy *Trichoderma reesei* (Q92456) ukázalo skóre len okolo 14, ale na druhej strane práve táto štruktúra bola použitá ako základ pre úspešné modelovanie Q5K805 (<http://www.proteinmodelportal.org>).

Zvláštnosťou je, že napriek extrémne nízkemu skóre (27-29), sa v rodine GH 36 nachádzajú okrem Q5K805 a Q55IG4 proteíny, ktoré sú označené ako α -galaktozidázy, rafinózosyntázky a necharakterizované proteíny, ktoré patria iným nebezpečným, najmä plúcnym patogénom, akými sú *Paracoccidioides brasiliensis* (C1G7A4, C1HD76), *Coccidioides posadasii* (E9D6H0, C5P454) *Ajjelomyces capsulata* (A6RBA6, C0NUM4, F0U412, C6H229) a *Ajjelomyces dermatitidis* (C5GDI0).

Na záver sa dá konštatovať, že táto skupina enzýmov sa vyznačuje extrémne nízkou podobnosťou na úrovni primárnej štruktúry, ale spoločná katalytická aktivita je zabezpečená vysokou podobnosťou terciárnych štruktúr. Na základe uvedeného je vysoká pravdepodobnosť, že práve proteín Q5K805 je zodpovedný za publikovanú aktivitu α -galaktozidázy *C. neoformans* (Maceková a kol., 2006).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**: 233
Comfort D.A., Bobrov K.S., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Harris J.M., Kulminskaya A.A., Brumer H., Kelly R.M. (2007) *Biochemistry*, **46**: 3319
Loftus B.J., Fung E., Roncaglia P. a kol. (2005) *Science*, **307**:1321
Maceková D. Farkaš V., Kishida E., Takeo K. (2006) *J. Basic Microbiol.*, **46**: 470
Pirofski L. A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**: 475

Charakterizácia intracelulárnej α -galaktozidázy *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Soňa Garajová, Eva Stratilová, Nadežda Kolarova a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava; *chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, α -galaktozidáza, charakterizácia enzymu

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Rearanžovanie kapsule počas pučania, resp. uvoľňovanie kapsulárnych polysacharidov, by mohli byť dôsledkom jednak fyzikálnych dejov (Zaragoza et al., 2006) ako aj činnosti enzymov s hydrolytickými a transglykozylačnými aktivitami. Jedným z takýchto enzymov je α -galaktozidáza, ktorá by sa mohla zúčastňovať galaktózového metabolizmu, ktorý niektorí autori (Moyrand a kol., 2007) považujú za jeden z kľúčových faktorov premeny kapsuly.

Náplňou tejto práce bola charakterizácia α -galaktozidázy z cytozolu (CF) a membrán (EMF) kapsulárneho kmeňa *C. laurentii* kultivovaného na semisyntetickom médiu s laktózou ako zdrojom uhlíka. Laktóza indukovala aj produkciu povrchovej α -galaktozidázy, ale vzhľadom na prítomnosť kapsulárnych polysacharidov nebolo možné tento enzym purifikovať.

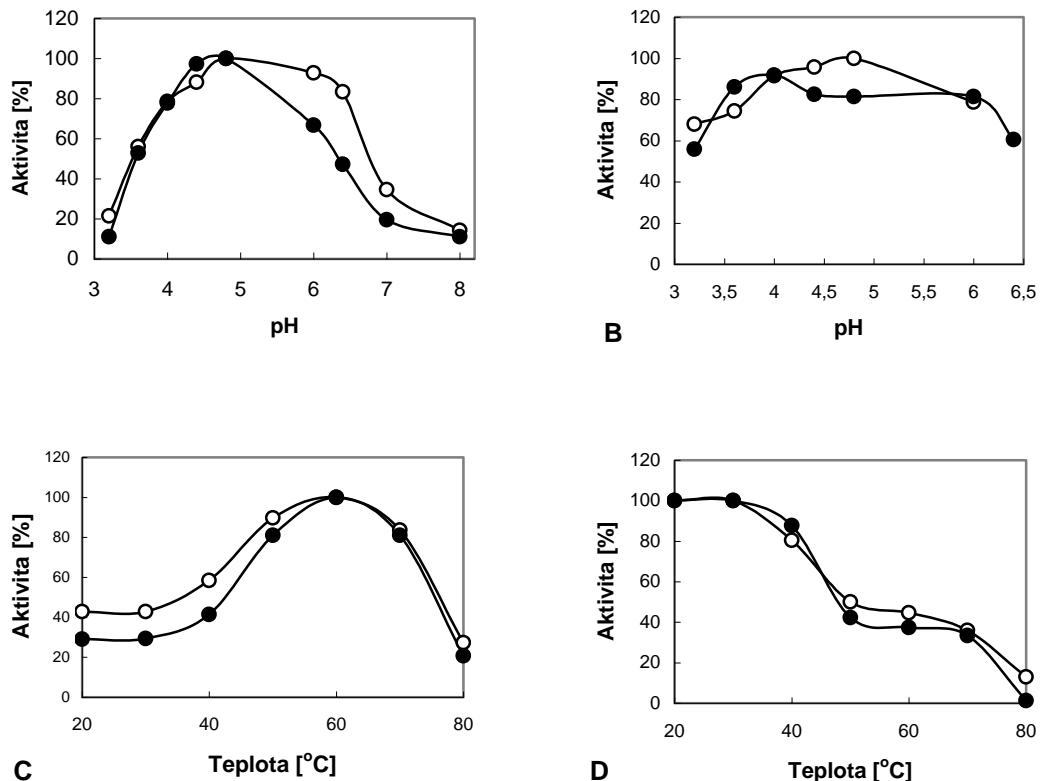
Materiál a metódy

Kapsulárny kmeň *C. laurentii* 17-3-29 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástol v semisyntetickom médiu s 2% laktózou ako zdrojom uhlíka, až pokým nedosiahol exponenciálnu fázu rastu. Po premytí buniek boli z cytozolu a po extrakcii proteínov aj z membrán izolované proteíny podľa Ankel a kol. [1970] a Yanagisawa a kol. [1990]. α -Galaktozidáza bola v týchto frakciách charakterizovaná na základe stanovenia pH optima, pH stability, teplotného optima, tepelnej stability, kinetických konštánt, izoelektrických bodov (IEF-PAGE s detekciou na aktivitu) a transglykozylačnej aktivity tohto enzymu (vyhodnotená TLC).

α -Galaktozidázová aktivita bola stanovená na PNP- α -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená prídavkom 4% Na₂CO₃ a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm.

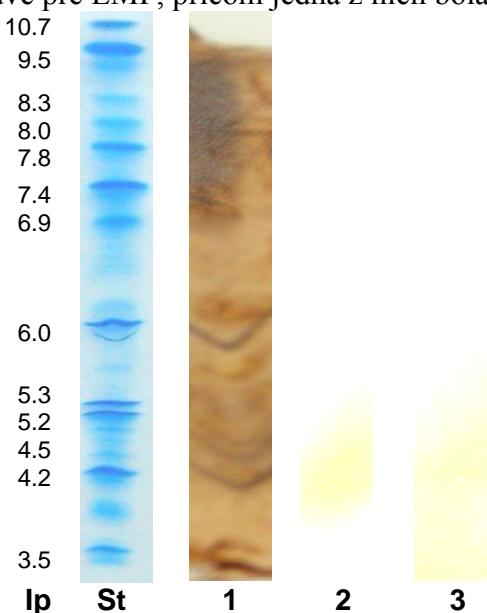
Výsledky a diskusia

Základné charakteristiky α -galaktozidázy z CF a EMF ako pH optimum, pH stabilita, teplotné optimum a tepelná stabilita sú zobrazené na Obr. 1.



Obr. 1. Charakterizácia α -galaktozidázy z CF (○—○) a EMF (●—●). A – pH optimum, B – pH stabilita, C – teplotné optimum, D – tepelná stabilita.

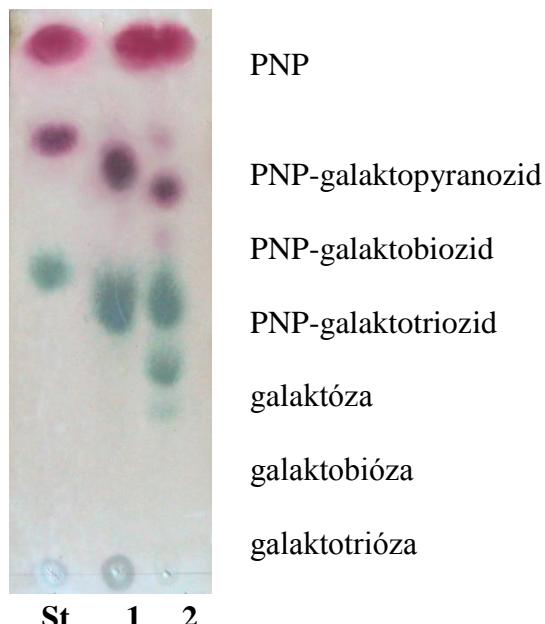
Výsledky charakterizácie (Obr. 1) naznačujú prítomnosť viacerých foriem α -galaktozidázy aj v CM ajv EMF, ale izoelektrická fokusácia s detekciou na aktivitu ukázala len jednu formu pre CF a dve pre EMF, pričom jedna z nich bola identická (Obr. 2).



Obr. 2. Izoelektrická fokusácia α -galaktozidázy z CF a EMF. Ip – izoelektrické body štandardov, St – štandard (detekcia Coomassie blue), 1 – prečistená CF (detekcia striebrom), 2 – prečistená CF (detekcia na aktivitu), 3 - prečistená EMF (detekcia na aktivitu).

K_m enzýmu z CF zodpovedala hodnota 1.28 mmol/l, z EMF 1.39 mmol/l. Tieto relatívne vysoké hodnoty voči semisyntetickému substrátu akým je PNP- α -galaktoypyranozid, boli porovnateľné s hodnotami publikovanými inými autormi (Puchart a kol., 2000).

Transglykozylačná aktivita α -galaktozidázy z CF bola vyhodnotená pomocou TLC (Obr. 3). Reverzná hydrolýza pozorovaná nebola.



Obr. 3. Tenkovrstvová chromatografia produktov transglykozylačnej reakcie α -galaktozidázy z CF, St – galaktóza, PNP-galaktoypyranozid a PNP ako štandardy, 1 – reakčná zmes zložená zo sacharidov uvedených v St s enzýmom v čase nula, 2 – reakčná zmes po 24 hod.

Poděkovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Ankel H., Ankel E., Schutzbach J. S., Garancis J. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**:3945
Moyrand F., Fontaine T., Janbon G. (2007) *Mol. Microbiol.* **64**:771
Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**:475
Puchart, V., Vršanská M., Bhat M.K., Biely P. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* **1524**: 27
Yanagisawa K., Resnick D., Abeijon C., Robbins P.W., Hirschberg C.B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:19351
Zaragoza O., Telzak A., Bryan A. R., Dadachova E., Casadevall A. (2006) *Mol. Microbiol.* **9**:67

Identifikácia kontaminácie membránových proteínov *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou

Csilla Mészárosová, Pavel Řehulká, Helena Řehulková, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chemjmuc@savba.sk

^aÚstav molekulárnej patologie FVZ, Univerzita obrany, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, membránové proteíny, proteomika, hmotnostná spektrometria

Úvod

Kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi všeobecne rozšírené patogény. Ich najdôležitejším virulentným faktorom je polysacharidová kapsula, ktorá ich chráni pred nepriaznivými podmienkami prostredia vrátane imunitnej odpovede napadnutého organizmu [Pirofski a Casadevall, 1996]. Faktory, ktoré by mohli ovplyvňovať premeny kapsúl, sú preto predmetom výskumu pracovísk na celom svete. Súčasťou tohto výskumu je štúdium proteínov, ktoré by sa mohli týchto premien zúčastňovať.

Predmetom tejto práce bola identifikácia majoritných membránových proteínov *C. laurentii* hmotnostnou spektrometriou. Výsledky poukázali na kontamináciu vzorky baktériami.

Materiál a metódy

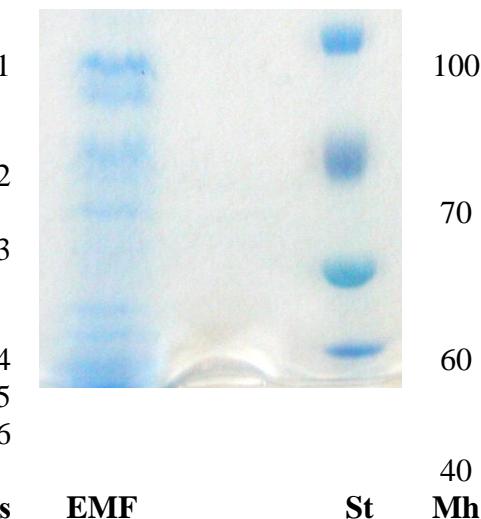
Kmeň *C. laurentii* CCY 17-3-29 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástol na semisyntetickom médiu s 2% laktózou ako zdrojom uhlíka až pokým nedosiahol exponenciálnu fázu rastu. Po premytí buniek a extrakcii proteínov sa membránová frakcia (EMF) izolovala podľa Ankel a kol. [1970] a Yanagisawa a kol. [1990].

SDS-PAGE pre vizualizáciu majoritných proteínov v EMF sa robila podľa Laemli [1970]. Proteínové pásy vizualizované Coomassie blue, ktoré reprezentovali majoritný intracelulárny proteóm *C. laurentii*, boli spracované podľa protokolu Jensen a kol. [1999]. MALDI-TOF/TOF MS merania po tryptickom štiepení proteínov boli robené na Applied Biosystems 4800 Proteomics Analyzer. Surové spektrálne údaje sa spracovali Data Explorer 4.6 softvérkom. MS údaje sa ďalej spracovali programom Mascot, pomocou ktorého prebehlo vyhľadávanie v databázach na báze identity a podobnosti primárnych štruktúr proteínov.

Výsledky a diskusia

Pokus o identifikáciu majoritných membránových proteínov kvasiniek *C. laurentii* rastúcich na médiu s laktózou ako zdrojom uhlíka metódami proteomiky priniesol tieto výsledky:

S výnimkou malátdehydrogenázy, ktorá bola aj majoritným intracelulárnym proteínom huby *Aspergillus niger* [Lu a kol. 2010] sa membránové proteíny dali identifikovať pomerne ľahko, keďže ich homológia bola väčšia s proteínmi z baktérií (*Streptococcus thermophilus*) ako s proteínmi *C. neoformans* (10 – 52 % homológia; Loftus a kol., 2005). Identifikáciu komplikoval aj fakt, že väčšina proteínov *C. neoformans* nie je identifikovaná na úrovni ich funkcie. Okrem Clp proteázy a glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy boli identifikované tri rôzne chaperóny (Obr. 1, Tab. 1).



Obr. 1: SDS-PAGE EMF: EMF, surová EMF; St, štandard; Mh, molekulové hmotnosti štandardov; pás, identifikácia proteínov v Tab. 1

Tab. 1: Identifikácia proteínov v surovej EMF v géli po SDS-PAGE (Obr. 1) pomocou Mascot programu. V tabuľke je uvedený počet identifikovaných sekvencií s počtom aminokyselín s percentuálnou homológiou s proteínnimi z Uniprot databázy charakterizovanými ich databázovým číslom.

Pás	Proteín	Organizmus	Uniprot databázové číslo	Počet sekvencií /AK v sekvenciách	Homológia [%]
1	chaperón ClpB (HSP100)	<i>S. thermophilus</i>	<u>Q03J94</u>	28 / 9-30	100
		<i>C. neoformans</i>	<u>Q5KI12</u>		10
		<i>C. gattii</i>	<u>E6R4N2</u>		11
2	chaperón DnaK (HSP70)	<i>S. thermophilus</i>	<u>E4SQK5</u>	15 / 11-33	100
		<i>C. neoformans</i>	<u>Q5K8W5</u>		51
		<i>C. gattii</i>	<u>E6R5W6</u>		52
3	chaperonín groEL (HSP60)	<i>S. thermophilus</i>	<u>E4SR15</u>	23 / 11-27	100
		<i>C. neoformans</i>	<u>Q5KLW7</u>		49
		<i>C. gattii</i>	<u>E6QZE7</u>		50
4	“trigger” faktor*	<i>S. thermophilus</i>	<u>Q5M6C2</u> , <u>Q03MQ9</u>	12 / 10-27	100
		<i>C. neoformans</i>	-		-
		<i>C. gattii</i>	-		-
5	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	<i>S. thermophilus</i>	<u>Q5M2M7</u>	8 / 11-17	100
		<i>C. neoformans</i>	<u>Q9Y8E9</u>		47
		<i>C. gattii</i>	<u>E6R7Z5</u>		46
6	malátdehydrogenáza	<i>C. neoformans</i>	<u>Q5KDL9</u>	7 / 11-33	100

* - nájdený len v baktériach

Záverom sa dá zhŕnúť, že s výnimkou malátdehydrogenázy v páse 6, ktorá je bežným majoritným intracelulárnym proteínom [Lu a kol. 2010], pásy 1 – 5 pochádzajú skôr z kontaminácie vzorky baktériami *Streptococcus*, ku ktorej muselo dôjsť v priebehu extrakcie proteínov z membránovej frakcie. Na tento fakt poukazovala aj identifikácia tzv. „trigger“ faktoru (Tab. 1, pás 4), ktorý je typický pre prokaryotické mikroorganizmy a v eukaryontoch sa vôbec nenachádza.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excellentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a dlhodobého zámeru rozvoja organizáce 1011 Fakulty vojenského zdravotníctva Univerzity obrany Českej republiky.

Literatúra

- Ankel H., Ankel E., Schutzbach J. S., Garancis J. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**:3945
Jensen O.N., Wilm M., Shevchenko A., Mann M. (1999) In: Link A. J. (Ed.), Methods in Molecular Biology: 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, pp. 513-530
Laemmli U. K. (1970) *Nature* **227**:680
Loftus B.J., Fung E., Roncaglia P. a kol. (2005) *Science* **307**:1321
Lu X., Sun J., Nimtz M., Wissing J., Zeng A.-P., Rinas U. (2010) *Microbial Cell Factories* **9**:23
Pirofski L. A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**: 475
Yanagisawa K., Resnick D., Abeijon C., Robbins P.W., Hirschberg C.B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:19351

Proteóm cytozolu kvasiniek *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Pavel Řehulká, Helena Řehulková, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chemjmuc@savba.sk

^aÚstav molekulárnej patologie FVZ, Univerzita obrany, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, cytozol, proteomika, proteóm, hmotnostná spektrometria

Úvod

Kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi všeobecne rozšírené patogény. Ich najdôležitejším virulentným faktorom je polysacharidová kapsula, ktorá ich chráni pred nepriaznivými podmienkami prostredia vrátane imunitnej odpovede napadnutého organizmu [Pirofski a Casadevall, 1996].

Predmetom tejto práce bola identifikácia majoritného cytozolového proteómu *C. laurentii* s cieľom zistiť, či sa v nôm nachádzajú enzýmy, ktoré by mohli byť zodpovedné za premeny kapsuly v priebehu kolonizácie hostiteľa. Ako zdroj uhlíka pri kultivácii kvasiniek bola použitá laktóza, ktorá výrazne indukovala produkciu α -galaktozidázy, ktorá by sa mohla zúčastňovať galaktózového metabolizmu spájaného s premenami kapsuly (Moyrand a kol., 2007).

Materiál a metódy

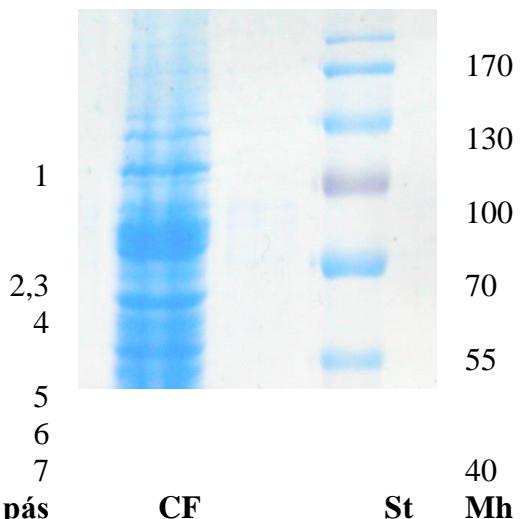
Kmeň *C. laurentii* CCY 17-3-29 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástol na semisyntetickom médiu s 2% laktózou ako zdrojom uhlíka až pokým nedosiahol exponenciálnu fázu rastu. Po premytí buniek sa cytozolová (CF) frakcia izolovala podľa Ankel a kol. [1970] a Yanagisawa a kol. [1990].

SDS-PAGE pre vizualizáciu majoritných proteínov v CF a EMF sa robila podľa Laemli [1970]. Proteínové pásy vizualizované Coomassie blue, ktoré reprezentovali majoritný cytozolový proteóm *C. laurentii*, boli spracované podľa protokolu Jensen a kol. [1999]. MALDI-TOF/TOF MS merania po tryptickom štiepení proteínov boli robené na Applied Biosystems 4800 Proteomics Analyzer. Surové spektrálne údaje sa spracovali Data Explorer 4.6 softvérkom. MS údaje sa ďalej spracovali programom Mascot, pomocou ktorého prebehlo vyhľadávanie v databázach na báze identity a podobnosti primárnych štruktúr proteínov.

Výsledky a diskusia

Identifikácia majoritných intracelulárnych proteínov kvasiniek *C. laurentii* rastúcich na médiu s laktózou ako zdrojom uhlíka metódami proteomiky priniesla tieto zaujímavé výsledky:

1. Sedem majoritných proteínov cytozolu *C. laurentii* (izocitrátdehydrogenáza, fosfoglycerátkináza, bifunkčná 6-fosfofrukto-2-kináza/fruktóza-2,6-bisfosfatáza, HSP 60, fosfoglukomutáza, fosfoglycerátmutáza a dlhoreťazcová alkoholoxidáza) sa dá pomerne ľahko identifikovať vďaka ich podobnosti s proteínmi *C. neoformans* a *C. gatii* (Obr. 1, Tab. 1), pričom *C. neoformans* má známy kompletný proteóm [Loftus a kol. 2005].



Obr. 1: SDS-PAGE CF: CF, surová CF; St, štandard; Mh, molekulové hmotnosti štandardov; pás, identifikácia proteínov v Tab. 1

Tab. 1: Identifikácia proteínov v surovej CF v géli po SDS-PAGE (Obr. 1) pomocou Mascot programu. V tabuľke je uvedený počet identifikovaných sekvencií s počtom aminokyselín so 100 % homológiou s proteínom z Uniprot databázy charakterizovaným jeho databázovým číslom.

Pás	Proteín	Organizmus	Uniprot databázové číslo	Počet sekvencií /AK v sekvenciách
1	alkoholoxidáza	<i>C. gattii</i>	<u>Q5Y238</u> ,	14 / 8 – 24
2	fosfoglycerátmutáza	<i>C. neoformans</i>	<u>Q5K9Y3</u>	9 / 8 – 18
3	fosfoglukomutáza	<i>C. neoformans</i>	<u>Q5K7B5</u>	8 / 10-23
4	HSP60	<i>C. gattii</i> , <i>C. neoformans</i>	<u>E6QZE7</u> <u>Q5KLW7</u>	5 / 15-19
5	6-fosfofrukto-2-kináza/ fruktózo-2,6-bisfosfatáza	<i>C. neoformans</i>	<u>Q5KB65</u>	12 / 11-29
6	fosfoglycerátkináza	<i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i>	<u>Q5KE00</u> <u>E6R9I3</u>	4 / 12-15
7	izocitrátdehydrogenáza	<i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i>	<u>Q5KP10</u> <u>E6QXT2</u>	7 / 10-23

2. Glykozidhydrolázy vrátane intenzívne indukovanej α -galaktozidázy, ktoré by sa mohli zúčastňovať premien polysacharidovej kapsuly ako aj metabolizmu laktózy ako C-zdroja, sa v cytozole ako majoritné proteíny nenachádzajú (Tabuľka 1).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a dlhodobého zámeru rozvoja organizáce 1011 Fakulty vojenského zdravotníctva Univerzity obrany Českej republiky..

Literatúra

- Ankel H., Ankel E., Schutzbach J. S., Garancis J. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**:3945
Jensen O.N., Wilm M., Shevchenko A., Mann M. (1999) In: Link A. J. (Ed.), Methods in Molecular Biology: 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, pp. 513-530
Laemmli U. K. (1970) *Nature* **227**:680
Loftus B.J., Fung E., Roncaglia P. a kol. (2005) *Science* **307**:1321
Moyrand F., Fontaine T. a Janbon G. (2007) *Mol. Microbiol.* **64**: 771.

Pirofski L. A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**: 475

Yanagisawa K., Resnick D., Abeijon C., Robbins P.W., Hirschberg C.B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:19351

Vplyv zdroja uhlíka kultivačného média na indukciu glykozidáz kvasinkou *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava; *chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, glykozidázy, kapsulárne polysacharidy

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Rearanžovanie kapsule počas pučania, resp. uvoľňovanie kapsulárnych polysacharidov, by mohli byť dôsledkom jednak fyzikálnych dejov (Zaragoza et al., 2006) ako aj činnosti enzýmov s hydrolytickými a transglykozylačnými aktivitami.

Náplňou tejto práce bolo štúdium kmeňových rozdielov a vplyvu uhlíkového zdroja kultivačného média na tvorbu glykozidáz kvasinkou *C. laurentii*.

Materiál a metódy

Kapsulárne kmene *C. laurentii* CCY 17-3-17, 17-3-29 a 17-3-31 a akapsulárny kmeň 17-3-6 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástli v semisyntetickom médiu s 2% glukózou ako zdrojom uhlíka, až pokým nedosiahli exponenciálnu fázu rastu. Po premytí buniek sa stanovili povrchové aktivity α - a β -galaktozidázy, α - a β -glukozidázy, α -manozidázy a β -xylozidázy.

Na základe výsledkov bol pre ďalšie experimenty vybraný kmeň CCY 17-3-29. Testovala sa produkcia povrchových glykozidáz na 2% glukóze, 4% glukóze, 2% sacharóze, 2% celobióze a 2% laktóze ako C- zdrojoch. Hladiny glukózou a laktózou indukovaných glykozidáz sa potom stanovili aj v cytozolovej (CF) a po extrakcii proteínov aj v membránovej frakcii (EMF), ktoré sa z buniek izolovali podľa Ankel a kol. [1970] a Yanagisawa a kol. [1990].

Produkcia vybraných povrchových glykozidáz sa sledovala aj na glukuronoxylomanáne (GXM) ako C-zdroji, pričom GXM je považovaný za hlavnú zložku kapsúl. Porovnávali sa aktivity indukované na povrchu kapsulárneho (CCY 17-3-29) a akapsulárneho (CCY 17-3-6) kmeňa.

Glykozidázové aktivity boli stanovené na príslušné PNP- α/β -glykopyranozidy ako substráty. Reakcia bola zastavená príďavkom 4% Na_2CO_3 a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm.

Výsledky a diskusia

Porovnanie sledovaných glykozidázových aktivít na povrchu troch kapsulárnych a jedného akapsulárneho kmeňa *C. laurentii* zobrazuje Tab. 1.

Tab. 1: Povrchové glykozidázové aktivity rôznych kmeňov kvasiniek *Cryptococcus laurentii*. Ako zdroj uhlíka v rastovom médiu bola použitá 2% glukóza.

Enzým	Glykozidázová aktivita kmeňa [pkat. 10^{-8} buniek]			
	17-3-6*	17-3-17	17-3-29	17-3-31
α -galaktozidáza	2,2	176,8	221,7	200,7
β -galaktozidáza	17,7	29,7	12,6	51,4
α -glukozidáza	11,3	79,7	25,0	19,5
β -glukozidáza	167,8	246,4	227,2	275,0
α -manozidáza	0,3	34,1	42,4	44,3
β -xylozidáza	58,3	19,0	13,2	10,1

*akapsulárny kmeň

Ako vyplýva z tabuľky, kapsulárne kmene vykazovali s výnimkou β -xylozidázy všeobecne vyššie aktivity glykozidáz ako akapsulárny kmeň. Vo všetkých prípadoch bola zaznamenaná najvyššia aktivita β -glukozidázy, ktorú nasledovala u kapsulárnych kmeňov α -galaktozidáza a u akapsulárneho už spomenutá β -xylozidáza. Na základe najvyššej aktivity α -galaktozidázy bol pre ďalšie experimenty vybraný kmeň CCY 17-3-29.

Porovnanie sledovaných glykozidázových povrchových aktivít buniek CCY 17-3-29 na rôznych zdrojoch uhlíka zobrazuje Tab. 2.

Tab. 2: Vplyv zdroja uhlíka na indukciu povrchových glykozidáz kapsulárneho kmeňa kvasiniek *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-29.

Enzým	Glykozidázová aktivita na rôznych zdrojoch uhlíka [pkat. 10^{-8} buniek]				
	2% glukóza	4% glukóza	2% sacharóza	2% celobióza	2% laktóza
α -galaktozidáza	221,7	38,5	49,5	593,8	1395,0
β -galaktozidáza	12,7	3,02	0	68,5	38,5
α -glukozidáza	25,0	6,9	23,7	44,8	69,3
β -glukozidáza	227,2	18,9	12,7	638,6	635,3
α -manozidáza	42,4	6,9	2,5	76,2	55,5
β -xylozidáza	13,2	13,5	0,8	82,2	74,5

V porovnaní s 2% glukózou pôsobila 2% sacharóza a 4% glukóza ako represor všetkých skúmaných glykozidáz. Výnimkou bola β -xylozidáza v prípade 4% glukózy. Naopak 2% celobióza a 2% laktóza pôsobili ako induktory vo všetkých prípadoch. Majoritnými enzýmami boli ako v prípade 2% glukózy β -glukozidáza (nazývaná aj celobiáza), ktorú v prípade indukcie 2% laktózou prekonala aktívita α -galaktozidázy (melibiáza), čo sa dá považovať za pomerne prekvapujúci výsledok. Naviac sa zdá, že naopak β -galaktozidázu (laktázu) najviac indukuje celobióza.

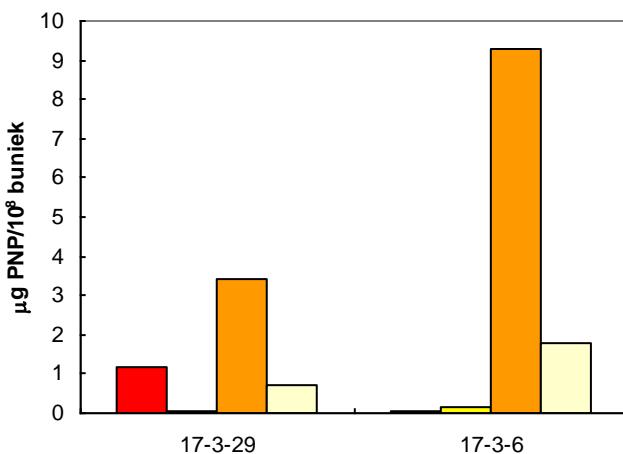
Aktivity vybraných glykozidáz sa sledovali aj v cytozole (CF) a membránach (v podobe extrahovanej membránovej frakcie, EMF) buniek CCY 17-3-29 rastúcich na 2% glukóze a 2% laktóze ako zdrojoch uhlíka (Tab. 3).

Tab. 3: Glukózou a laktózou indukované glykozidázové aktivity v cytosolovej (CF) a extrahovanej membránovej frakcii (EMF) kvasiniek *C. laurentii* CCY 17-3-29

Enzým	Glykozidázové aktivity [pkat/mg proteínu]			
	2% glukóza		2% laktóza	
	CF	EMF	CF	EMF
α -galaktozidáza	19,8	134,8	202,9	135,1
β -galaktozidáza	3,6	11,6	2,75	0,275
α -glukozidáza	2,5	9,9	4,67	2,4
β -glukozidáza	55,6	169,4	33,8	5,8
α -manozidáza	1,9	8,3	2,7	3,1
β -xylozidáza	1,1	59,7	5,2	0,5

Zámenou glukózy za laktózu ako C-zdroja v kultivačnom médiu bola v cytozole najviac ovplyvnená produkcia α -galaktozidázy, u ktorej bol zaznamenaný vyše 10-násobný nárast. Ďašší významnejší nárast sa zaznamenal u β -xylozidázy. Najvýznamnejšou zmenu glykozidáz viazaných na membrány bola represia β -glukozidázy (vyše 29-násobný pokles) a β -xylozidázy (skoro 120-násobný pokles). Vo všeobecnosti bol zaznamenaný pokles aktivít všetkých EMF glykozidáz s výnimkou α -galaktozidázy.

Ako ďalší zdroj uhlíka v kultivačnom médiu sa použil glukuronoxylomanán (GXM), ktorý je majoritnou zložkou kapsulárnych polysacharidov. Jeho hlavný reťazec je tvorený $\alpha(1 \rightarrow 3)$ manopyranózovými jednotkami substituovanými zvyškami xylózy a glukurónovej kyseliny [Bose a kol., 2003; McFadden a Casadevall, 2001; Doering, 2000; Reiss a kol., 1985]. Porovnávali sa aktivity indukované na povrchu kapsulárneho (CCY 17-3-29) a akapsulárneho (CCY 17-3-6) kmeňa (Obr. 1).



Obr. 1: Aktivita vybraných glykozidáz na povrchu *C. laurentii* CCY 17-3-29 (kapsulárny kmeň) a CCY 17-3-6 (akapsulárny kmeň): ■ - α -galaktozidáza, □ - α -manozidáza, ■■ - β -glukozidáza, □□ - β -xylozidáza.

Aktivity β -glukozidázy, α -manozidázy a β -xylozidázy boli jednoznačne vyššie u akapsulárneho kmeňa. Vzhľadom na štruktúru C-zdroja môžeme považovať takúto indukciu za očakávanú. Kapsulárny kmeň reagoval zvýšenou produkciou α -galaktozidázy ako to bolo

aj v prípade indukcie celobiózou a laktózou (Tab. 2). Táto zdanlivo nevysvetliteľná reakcia kapsulárneho mikroorganizmu vyžaduje ďalšie skúmanie v súvislosti s metabolizmom galaktózy, čo by mohlo súvisieť s predpokladanou dôležitou úlohou tohto metabolizmu vo virulentnom charaktere rodu *Cryptococcus*, ktorú v roku 2007 naznačil Moyrand a kol. Táto skupina totiž zistila, že veľkosť kapsuly a jej zbalenie závisia na vzájomnom pôsobení základných polysacharidových zložiek, GXM a GalXM (galaktoxylomanán). Mutant, ktorý neboli schopní syntetizovať GalXM mal väčšiu kapsulu, ako pôvodný divý kmeň. Z tohto sa predpokladalo, že na neprítomnosť GalXM bunka reaguje nadprodukciou molekúl GXM, čo má za následok zväčšenie kapsule. Tento fakt poukazuje na to, že GalXM hrá dôležitú úlohu v zachovaní štruktúry a veľkosti kapsuly. Ak by sme teda predpokladali, že nárast α -galaktozidázovej aktivity vedie k úbytku GalXM v kapsuliach, prejavilo by sa to zväčšením kapsúl. Vzhľadom na potenciálnu transglykozylačnú aktivitu tohto enzymu, by sa mohol zúčastňovať aj na opačnom procese.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Ankel H., Ankel E., Schutzbach J. S., Garancis J. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**:3945
Bose I., Reese A.J., Ory J.J., Janbon G., Doering T.L. (2003) *Eukaryot. Cell* **2**:655
Doering T.L. (2000) *Trends Microbiol.* **8**:547
McFadden D.C., Casadevall A. (2001) *Med. Mycol.* **39**:19
Moyrand F., Fontaine T., Janbon G. (2007) *Mol. Microbiol.* **64**:771
Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**:475
Reiss E., Huppert M., Cherniak R. (1985) *Curr. Top. Med. Mycol.* **1**:172
Yanagisawa K., Resnick D., Abeijon C., Robbins P.W., Hirschberg C.B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:19351
Zaragoza O., Telzak A., Bryan A. R., Dadachova E., Casadevall A. (2006) *Mol. Microbiol.* **59**:67

Vplyv zdroja uhlíka kultivačného média na indukciu α -galaktozidázy kvasinkou *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-29

Csilla Mészárosová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava; *chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, α -galaktozidáza, kapsulárne polysacharidy, zdroj uhlíka

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Moyrand a kol. (2007) zistili, že veľkosť kapsuly a jej zbalenie závisia na vzájomnom pôsobení základných polysacharidových zložiek, GXM (glukuronoxylomanán) a GalXM (galaktoxylomanán). Mutant, ktorý neboli schopný syntetizovať GalXM mal väčšiu kapsulu, ako pôvodný divý kmeň. Z tohto sa predpokladalo, že na neprítomnosť GalXM bunka reaguje nadprodukciou molekúl GXM, čo má za následok zväčšenie kapsule. Tento fakt poukazuje na dôležitosť metabolizmu galaktózy v zachovaní štruktúry a veľkosti kapsuly. Jedným z enzymov, ktorý by mohol prispievať k metabolizmu galaktózy, je α -galaktozidáza.

Náplňou tejto práce bolo štúdium vplyvu uhlíkového zdroja kultivačného média na rast kmeňa *C. laurentii* a s ním súvisiacu indukciu α -galaktozidázy. Ako vzorový kmeň bol vybraný kapsulárny kmeň CCY 17-3-29.

Materiál a metódy

Kapsulárny kmeň *C. laurentii* CCY 17-3-29 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástol v semisyntetickom médiu s rôznymi sacharidmi ako zdrojmi uhlíka. Sledovali sa rastové krivky (počítaním buniek a meraním prírastku absorbancie pri 660 nm) a sledovala povrchová aktivita α -galaktozidázy.

Aktivita α/β -galaktozidázy bola stanovená na PNP- α/β -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená príďavkom 4% Na₂CO₃ a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm.

Výsledky a diskusia

Vplyv uhlíkového zdroja kultivačného média na rast kvasinky *C. laurentii* CCY 17-3-29 a na aktivitu jeho povrchovej α -galaktozidázy zobrazuje Tab. 1.

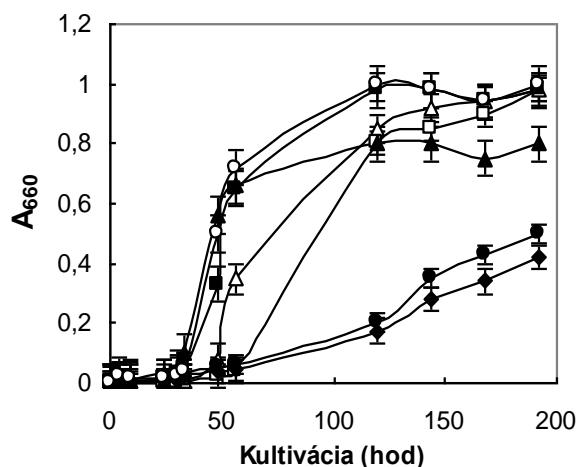
Výsledky uvedené v Tab. 1 potvrdzujú známú represiu produkcie α -galaktozidázy (Garro et al., 1996) glukózou a nevhodnosť laktózy ako substrátu tohto enzymu. Ako referenčnú aktivitu sme použili tú, ktorá bola produkovaná na médiu bez sacharidového zdroja, ktorá reprezentuje produkciu konštitutívneho enzymu. Glukóza, maltóza, celobióza a do menšej miery sacharóza slúžili ako represory, kým výsledky získané s galaktózou boli porovnatelné s referenčnými. Indukcia enzymu bola pozorovaná na laktóze, melibióze a rafinóze, t.j. sacharidoch, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú viazanú galaktózu. Aktivity na melibióze

a rafinóze boli nižšie ako na laktóze, ale rast kmeňa bol zrovnatelný s tým na iných sacharidoch (Obr. 1), kým rast na laktóze jednoznačne poukazoval na nevhodnosť laktózy ako C-zdroja.

Tabuľka 1. Vplyv C-zdroja kultivačného média na rast *C. laurentii* CCY 17-3-29 a na aktivitu jeho povrchovej α -galaktozidázy. Výsledky stanovené po 48 hod kultivácie.

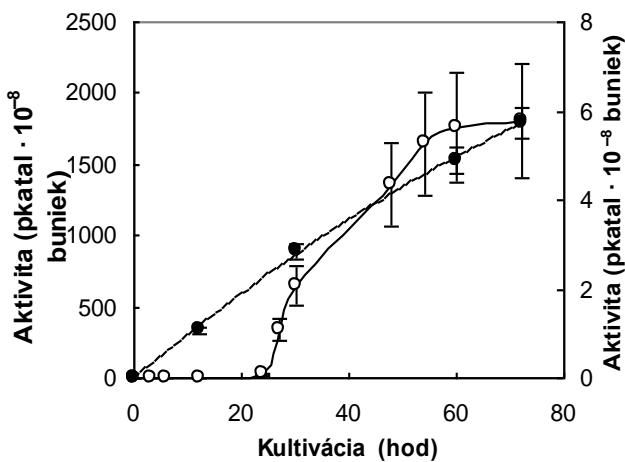
C-zdroj	Aktivita [pmol.s ⁻¹ .ml ⁻¹ kultivačného media s bunkami]	Počet buniek $\times 10^8$. ml ⁻¹ kultivačného média	A*
Bez C-zdroja	2.3 ± 0.1	0.059 ± 0.009	48.80
Glukóza	0	1.457 ± 0.118	0
Galaktóza	33.0 ± 2.3	0.928 ± 0.055	41.81
Maltóza	0	0.180 ± 0.011	0
Celobióza	0	0.083 ± 0.013	0
Sacharóza	1.01 ± 0.1	0.220 ± 0.040	4.59
Laktóza	93.0 ± 5.6	0.084 ± 0.005	1056.82
Melibióza	123.0 ± 9.8	0.830 ± 0.089	148.19
Rafinóza	56.0 ± 4.8	0.430 ± 0.065	130.23

* - vypočítané z priemerných hodnôt stanovených pre aktivitu a počet buniek v ml média



Obr. 1. Rastové krivky CCY 17-3-29 na médiach s rôznymi sacharidmi; maltóza (Δ), celobióza (\square), sacharóza (\circ), laktóza (\bullet), laktóza pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ (\blacklozenge), melibióza (\blacksquare), rafinóza (\blacktriangle).

Pokus zmeniť podmienky kultivácie (teplotu kultivácie) rastovú krivku na laktóze ako C-zdroji výrazne neovplyvnilo (Obr. 1). Predĺženie kultivácie na takomto médiu viedlo k indukcii povrchovej α -galaktozidázy, ktorá dosahovala maximum medzi 48–72 hod a mala hodnoty $1.8\text{--}2.3\text{ }\mu\text{mol s}^{-1}\text{ }10^{-8}$ buniek (Obr. 2). Po 72 hod bol pozorovaný pokles aktivity (okolo 50 % v 144 hod). Ako je vidieť, maximum α -galaktozidázovej aktivity bolo dosiahnuté v predĺženej logaritmickej faze rastu, ktorá zodpovedá intenzívnej prestavbe kryptokokálnej kapsuly (Schutzbach et al., 2007). Síce malý ale kontinuálny nárast aktivity β -galaktozidázy (Obr. 2) sa pravdepodobne prejavil v pomalom ale vztrvalom raste kmeňa *C. laurentii*.



Obr.2. Aktivity povrchovej α -galaktozidázy (○) (pravá os) a β -galaktozidázy (●) (ľavá os) merané na bunkách *C. laurentii* CCY 17-3-29 počas kultivácie na médiu s 2 % laktózou ako C-zdrojom.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Garro, M. S., de Valdez, G. F., Oliver, G., de Giori, G. S. (1996) *Curr. Microbiol.*, **33**: 302
- Moyrand F., Fontaine T., Janbon G.(2007) *Mol.Microbiol.* **64**:771
- Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**:475
- Schutzbach, J., Ankel, H., Brockhausen, I. (2007) *Carbohydr. Res.*, **342**: 881

Identifikácia indukovateľnej α -galaktozidázy kvasiniek *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou

Csilla Mészárosová, Pavel Řehulka^a, Helena Řehulková^a, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chemjmuc@savba.sk

^aÚstav molekulárnej patologie FVZ, Univerzita obrany, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, *Cryptococcus neoformans*, α -galaktozidáza, hmotnostná spektrometria, proteomika

Úvod

Kvasinky rodu *Cryptococcus* patria medzi všeobecne rozšírené patogény. Ich najdôležitejším virulentným faktorom je polysacharidová kapsula, ktorá ich chráni pred nepriaznivými podmienkami prostredia vrátane imunitnej odpovede napadnutého organizmu [Pirofski a Casadevall, 1996]. Závažnosť kryptokokóz, ktoré mávajú smrteľné následky najmä pre imunodeficientných pacientov, prispela k určeniu kompletného proteómu hlavného zástupcu tohto rodu *C. neoformans* [Loftus a kol. 2005]. Tento pomáha pri identifikácii proteínov, ktoré sa zúčastňujú na virulentnosti ďalších kmeňov tohto rodu.

Táto práca je zameraná na kvasinku *C. laurentii*, ktorá bola pôvodne považovaná za zoopatogén, ale stále častejšie sa objavujú správy o jej škodlivosti pre človeka (Johnson a kol., 1998; Kordis a kol., 1998; Sugita a kol., 2000; Bauters a kol., 2001; Cheng a kol., 2001; Khawcharoenporn a kol., 2006; Shankar a kol., 2006) a na purifikáciu a identifikáciu indukovateľnej α -galaktozidázy na štrukturálnej úrovni.

Materiál a metódy

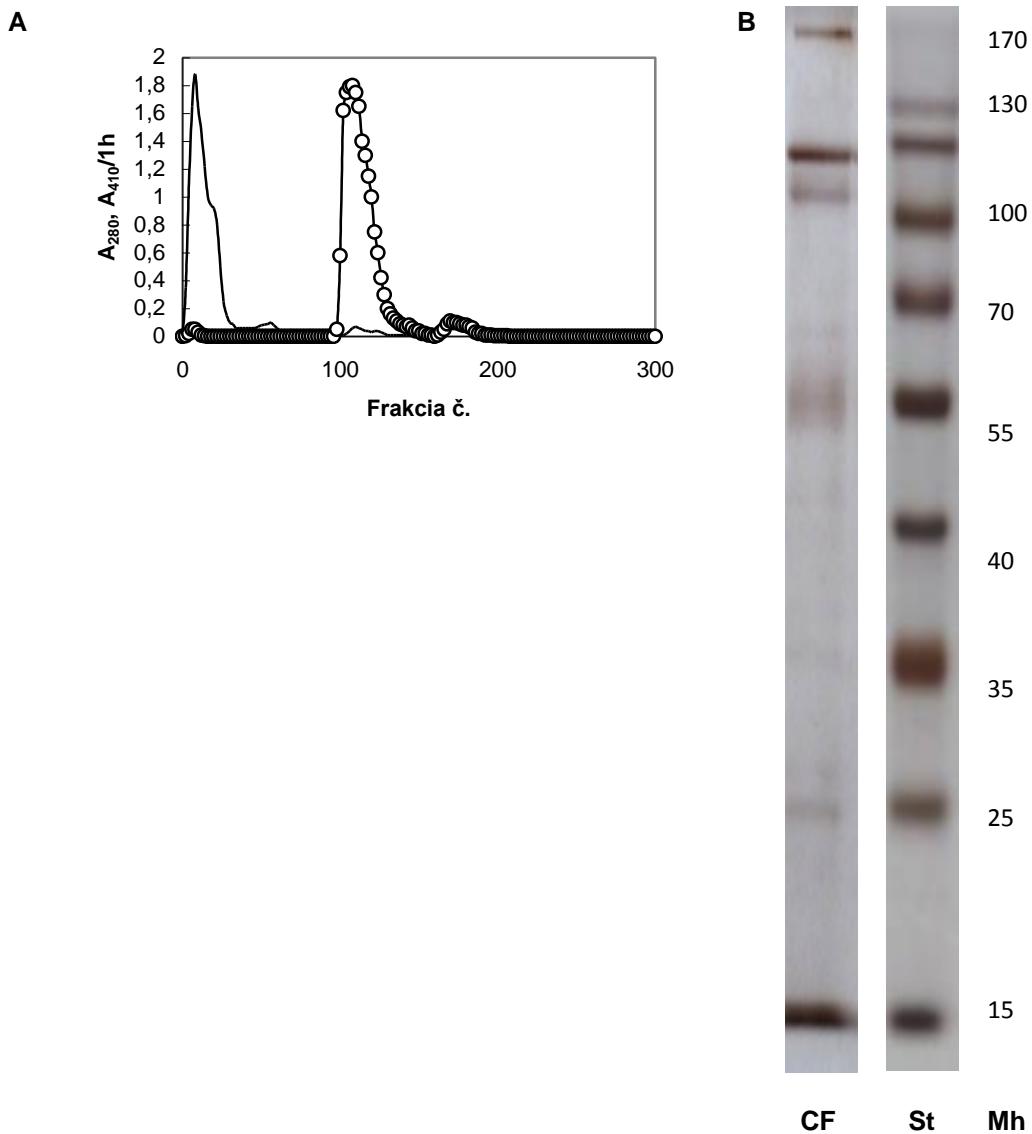
Kmeň *C. laurentii* CCY 17-3-29 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástol na semisyntetickom médiu s 2% laktózou ako zdrojom uhlíka až pokým nedosiahol exponenciálnu fázu rastu. Po premytí buniek sa cytozolová frakcia (CF) izolovala podľa Ankel a kol. [1970]. Frakcia bola prečistená kvapalinovou chromatografiou na kolóne s náplňou CM-Sephadex C-50.

α -Galaktozidázová aktivita bola stanovená na PNP- α -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená prídavkom 4% Na₂CO₃ a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm.

SDS-PAGE pre vizualizáciu majoritných proteínov v prečistenej CF sa robila podľa Laemli [1970]. Proteínové pásy boli vizualizované striebrom a ďalej boli spracované podľa protokolu Jensen a kol. [1999]. Separácia štepov po tryptickom štiepení probiehala pomocou jednoduchého mikrogradientového zariadenia napojeného na krátku (30 mm) kolónku s vnútorným priemerom 250 mikrometrov s 5 časticami Poroshell 300 C18 Extended. Eluent bol v 0.75 mikrolitrových objemoch nanášaný na MALDI doštičku s α -kyano-4-hydroxyškoricovou kyselinou ako matricou. Meranie prebehlo na prístroji 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). Databázové vyhľadávanie v NCBI prebehlo pomocou programu Mascot v. 2.3.

Výsledky a diskusia

α -Galaktozidáza z CF bola prečistená na kolóne s náplňou CM-Sephadex C-50 (Obr. 1A). Frakcie 105-130, ktoré boli uvoľnené z kolóny zmenou pH z 3,8 na 4,4, boli po odsolení, lyofilizácii a rozpustení v malom množstve vody nanesené na gél a separované pomocou SDS-PAGE (Obr. 1B).



Obr. 1. A – Purifikácia α -galaktozidázy z CF na kolóne CM-Sephadex C-50 ($- A_{280}$, bielkoviny, $\bigcirc A_{410}/h$, aktívita α -galaktozidázy). B - SDS-PAGE CF prečistenej na kolóne CM-Sephadex C-50 (frakcie 105-130): CF, čiastočne prečistená CF; St, štandard; Mh, molekulové hmotnosti štandardov.

Proteomická charakterizácia pásov zobrazených na Obr. 1B priniesla vzhľadom na nízku koncentráciu proteínov (nutnosť farbenia striebrom) výsledok len pre najvýraznejší pás s Mh tesne pod 130 kDa. Proteín bol identifikovaný na základe sekvencie „YPDVLWEGCASGGGR”, ktorá vykazovala 100% homológiu s proteínom QOU0J8_PHANO a E4ZKD6_LEPMJ (necharakterizovaný proteín *Phaeosphaeria nodorum* a proteín podobný α -galaktozidáze *Leptosphaeria maculans*) a 93% homológiu so sekvenciami α -galaktozidázy alebo pravdepodobnej α -galaktozidázy hub rodu *Aspergillus*, napr. AGALC_ASPOR, AGALC_ASPFN, AGALC_ASPNG a AGALC_EMENI (pravdepodobne α -galaktozidáza C *Aspergillus oryzae*, pravdepodobne α -galaktozidáza C

Aspergillus flavus, α -galaktozidáza C *Aspergillus niger*, α -galaktozidáza C *Emericella nidulans*, t.j. *Aspergillus nidulans*). Porovnanie s príslušnou sekvenciou proteínu *C. neoformans* Q5K805, ktorá patrí do GH 36 rodiny a mohla by mať α -galaktozidázovú aktivitu, ukázalo identitu len štyroch aminokyselín. Tento výsledok naznačuje, že ak Q5K805 reprezentuje α -galaktozidázu, ide o proteín, ktorý sa na úrovni primárnej štruktúry výrazne odlišuje od indukovanénej α -galaktozidázy *C. laurentii*.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excellentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a dlhodobého zámeru rozvoja organizáce 1011 Fakulty vojenského zdravotníctva Univerzity obrany Českej republiky..

Literatúra

- Ankel H., Ankel E., Schutzbach J. S., Garancis J. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**: 3945
Bauters, T.G.M., Swinne, D., T. Boekhout, T., Noens, L., Nelis, H.J. (2001) *Mycopathologia*, **153**: 133
Cheng, M. F., Chiou, C.C., Liu, Y.C., Wang, H.Z., Hsieh, K.S. (2001) *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 1608
Jensen O.N., Wilm M., Shevchenko A., Mann M. (1999) In: Link A. J. (Ed.), Methods in Molecular Biology: 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, pp. 513-530
Johnson, L.B., Bradley, S.F., Kauffman, C.A. (1998) *Mycoses*, **41**: 277
Khawcharoenporn, T., Apisarnthanarak, A., Kiratisin, P., Mundy, L. M., Bailey, T. C. (2006) *Hawaii Med. J.*, **65**: 260
Kordis, T., Avlami, A., Velegraki, A., Stefanou, I., Georgakopoulos, G., Papalambrou, C., Legakis, N. J. (1998) *Med. Mycol.*, **36**: 335
Laemmli U. K. (1970) *Nature* **227**: 680
Loftus B.J., Fung E., Roncaglia P. a kol. (2005) *Science* **307**:1321
Pirofski L. A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**: 475
Casadevall A. (2008) *Eucaryotic Cell*,**7**: 58
Shankar, E. M., Kumarasamy, N., Bella, D., Renuka, S., Kownhar, H., Suniti, S., Rajan, R., Rao U.A. (2006). *Can. Respir. J.*, **13**: 275
Sugita, T., Takashima, M., Ikeda, R., Nakase, T., Shinoda, T. (2000) *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 1468

Porovnanie zdroja uhlíka kultivačného média na rast kmeňa *Cryptococcus laurentii* a indukciu povrchovej α -galaktozidázy kapsulárny a akapsulárny kmeňom

Csilla Mészárosová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava; *chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, α -galaktozidáza, kapsulárne polysacharidy, kapsulárny kmeň,
akapsulárny kmeň

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Mostrand a kol. (2007) zistili, že veľkosť kapsuly a jej zbalenie závisia na vzájomnom pôsobení základných polysacharidových zložiek, GXM (glukuronoxylomanán) a GalXM (galaktoxylomanán). Niektoré výsledky naznačujú, že jedným z enzýmov, ktoré sa priamo zúčastňujú galaktózového metabolizmu čím ovplyvňujú reštrukturalizáciu kapsuly, by mohla byť α -galaktozidáza.

Náplňou tejto práce bolo štúdium vplyvu uhlíkového zdroja kultivačného média na rast kapsulárneho (17-3-6) a akapsulárneho (17-3-29) kmeňa *C. laurentii* a s ním súvisiacu indukciu α -galaktozidázy. Výsledky by mohli nepriamo potvrdiť úlohu α -galaktozidázy pri reštrukturalizácii kapsúl.

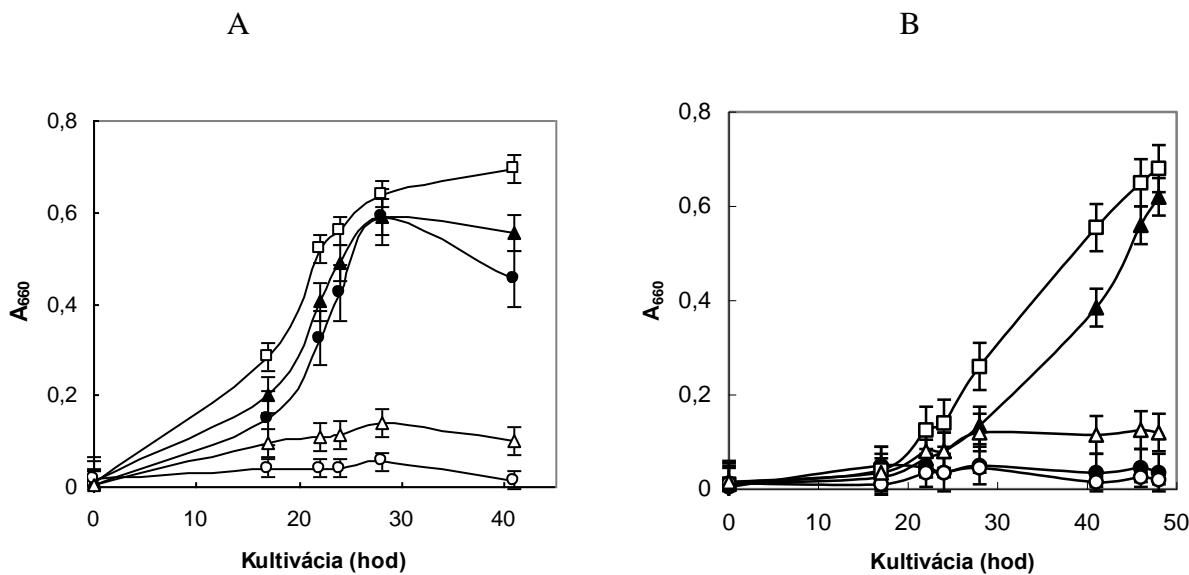
Materiál a metódy

Kapsulárny kmeň *C. laurentii* CCY 17-3-29 a akapsulárny kmeň CCY 17-3-6 (Zbierka kvaziniek CHÚ SAV) rástol v semisyntetickom médiu s rôznymi sacharidmi ako zdrojmi uhlíka. Sledovali sa rastové krivky (počítaním buniek a meraním prírastku absorbancie pri 660 nm) a sledovala povrchová aktivita α -galaktozidázy.

Aktivita α -galaktozidázy bola stanovená na PNP- α -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená prídavkom 4% Na₂CO₃ a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm.

Výsledky a diskusia

Vplyv C-zdroja kultivačného media na rast a produkciu α -galaktozidázy dvoch kmeňov, kapsulárneho CCY 17-3-29 a akapsulárneho CCY 17-3-6, zobrazuje Obr. 1 a Tab. 1. Výsledky ukazujú dôležité rozdiely medzi týmito dvomi kmeňmi. Najdôležitejší rozdiel bol pozorovaný, keď boli kmene kultivované na laktóze ako zdroji uhlíka, keďže akapsulárny kmeň na rozdiel od kapsulárneho bol schopný tento C-zdroj utilizovať (Obr. 1). EPS označuje extracelulárne polysacharidy získané z kultivačného média *C. laurentii* 17-3-20 podľa Barteka a kol. (2001).



Obr. 1. Rastové krivky *C. laurentii*: CCY 17-3-6 (akapsulár) (A) a CCY 17-3-29 (kapsulár) (B). Zdroje uhlíka v kultivačnom médiu: glukóza (□), galaktóza (▲), extracelulárne polysacharidy (Δ), laktóza (●), bez sacharidu (○).

Tabuľka 1. Aktivity povrchovej α -galaktozidázy kmeňov CCY 17-3-6 (akapsulár) a CCY 17-3-29 (kapsulár) rastúcich na médiach s rôznymi C-zdrojmi

C-zdroj	CCY 17-3-6		CCY 17-3-29	
	Počet buniek · 10^{-8} per mL	Aktivita (pmol s $^{-1}$ 10^{-8} buniek) ^a	Počet buniek · 10^{-8} per mL	Aktivita (pmol s $^{-1}$ 10^{-8} buniek) ^a
Glukóza	1.328 ± 0.199	0.14	1.457 ± 0.118	0
Galaktóza	0.859 ± 0.042	7.14	0.928 ± 0.055	41.81
EPS	0.130 ± 0.021	54.14	0.160 ± 0.027	10.72
Laktóza	1.215 ± 0.097	9.21	0.084 ± 0.005	1056.82
Bez C-zdroja	0.080 ± 0.096	180.00	0.059 ± 0.009	48.80

a) Vypočítané z priemerných hodnôt

Tabuľka 1 ukazuje aktivity povrchových α -galaktozidáz dosiahnutých po 42 hod kultivácie akapsulárneho kmeňa (stacionárna fáza rastu akapsuláru) a po 48 hod kultivácie kapsulárneho kmeňa (stále ešte exponenciálna fáza rastu pre kapsulár). Základný rozdiel je viditeľný v produkcií α -galaktozidázy, ktorá sprevádzá kultiváciu na laktózovom médiu. Napriek dramatickému nárastu povrchovej aktivity kapsulárneho kmeňa, aktivita akapsuláru bola skôr reprimovaná (Tab. 1). Výborný rast akapsulárneho kmeňa zas naznačoval produkciu vysokých hladín aktivít β -galaktozydázy, t.j. rozdielne zloženie hlavných povrchových glykozidáz kapsulárneho a akapsulárneho kmeňa.

Rast obidvoch kmeňov na EPS produkovaných kmeňom CCY 17-3-20 (používaným kvôli zlej rozpustnosti v koncentráции 1 %) a reprezentovaných najmä GXM (Bartek et al., 2001) bol sprevádzaný poklesom α -galaktozidázovej aktivity v porovnaní s bunkami rastúcimi bez C-zdroja. Bunky vykazovali vysokú viabilitu, čím naznačovali ochranný efekt EPS.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Bartek, P., Kolarova, N., Capek, P. (2001) *Chem. Pap.*, **55**: 261
Moyrand F., Fontaine T., Janbon G.(2007) *Mol.Microbiol.* **64**:771
Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**:475

Purifikácia intracelulárnej α -galaktozidázy *Cryptococcus laurentii*

Csilla Mészárosová, Soňa Garajová, Nadežda Kolarova, Eva Stratilová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava; *chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová

Cryptococcus laurentii, α -galaktozidáza, purifikácia

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Rearanžovanie kapsule počas pučania, resp. uvoľňovanie kapsulárnych polysacharidov, by mohli byť dôsledkom jednak fyzikálnych dejov (Zaragoza et al., 2006) ako aj činnosti enzýmov s hydrolytickými a transglykozylačnými aktivitami. Jedným z takýchto enzýmov je α -galaktozidáza, ktorá by sa mohla zúčastňovať galaktózového metabolizmu, ktorý niektorí autori (Moyrand a kol., 2007) považujú za jeden z kľúčových faktorov premeny kapsuly.

Náplňou tejto práce bola izolácia a purifikácia α -galaktozidázy z cytozolu (CF) a membrán (EMF) kapsulárneho kmeňa *C. laurentii* kultivovaného na semisyntetickom médiu s laktózou ako zdrojom uhlíka..

Materiál a metódy

Kapsulárny kmeň *C. laurentii* 17-3-29 (Zbierka kvasiniek CHÚ SAV) rástol v semisyntetickom médiu s 2% laktózou ako zdrojom uhlíka, až pokým nedosiahol exponenciálnu fázu rastu. Po premytí buniek boli z cytozolu a po extrakcii proteínov aj z membrán izolované proteíny podľa Ankel a kol. [1970] a Yanagisawa a kol. [1990]. α -Galaktozidáza bola z nich potom purifikovaná kvapalinovou chromatografiou (gélová filtračia, ionovýmenná a afinitná chromatografia). Priebeh purifikácie bol sledovaný SDS-PAGE.

α -Galaktozidázová aktivita bola stanovená na PNP- α -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená prídavkom 4% Na₂CO₃ a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm.

Výsledky a diskusia

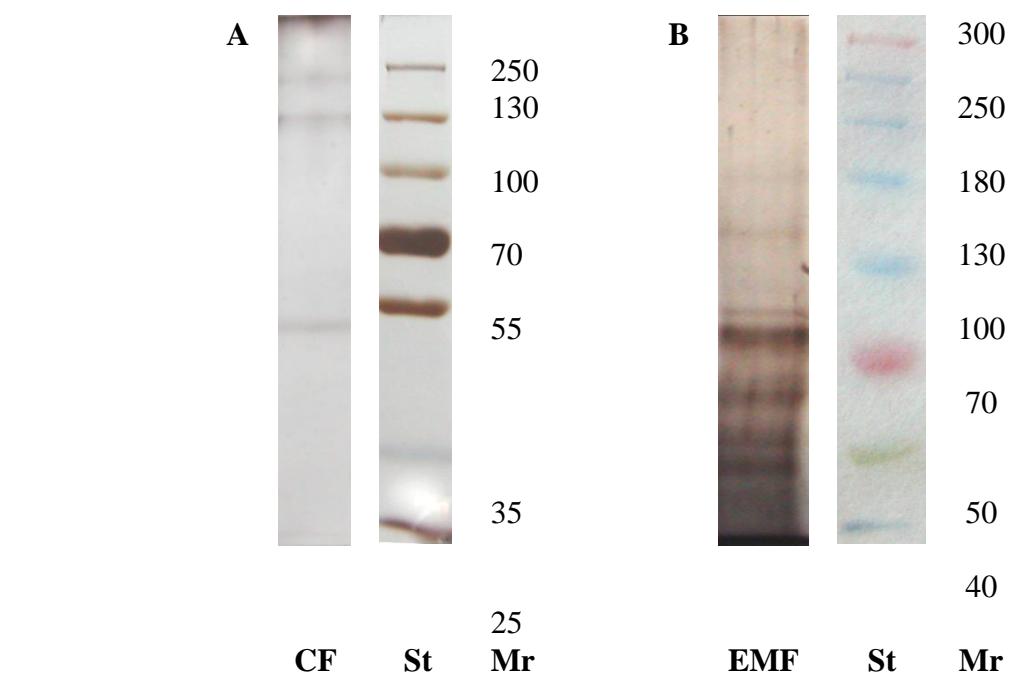
Priebeh purifikácie α -galaktozidázy z CF a EMF *C. laurentii* zobrazujú Tab. 1 (pre CF) a 2 (pre EMF) ako aj Obr. 1 (A pre CF a B pre EMF).

Tabuľka 1. Zostatkové aktivity a purifikačné faktory α -galaktozidázy z CF po jednotlivých purifikačných krokoch. Zostatkové aktivity sú vyjadrené ako percentá pôvodnej enzymovej aktivity v surovej CF (18 ml). Purifikačné faktory sú založené na špecifických aktivitách.

Purifikačný krok	Výťažok		Špecifická aktivita (pkat/mg)	Zostatková aktivita (%)	Purifikačný faktor (krát)
	Proteín (mg)	Aktivita (pkat)			
Surová CF	303.30	2669.04	8.80	100.00	1.00
CM-Sephadex C-50	20.25	443.48	21.9	16.62	2.49
ConA – Sepharose 4B	1.34	207.00	154.48	7.76	17.56
Superdex 75	0.033	29.34	888.96	1.10	101.02

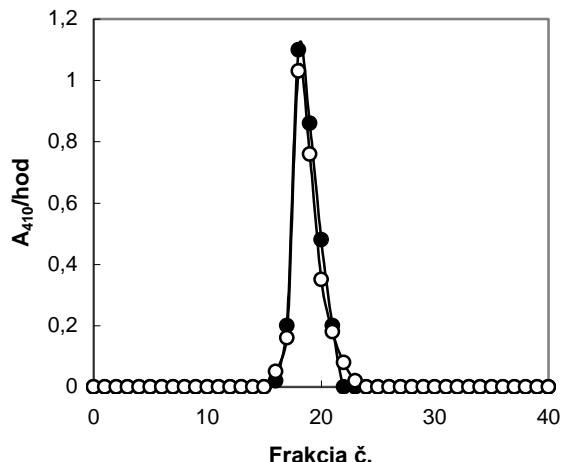
Tabuľka 2. Zostatkové aktivity a purifikačné faktory α -galaktozidázy z EMF po jednotlivých purifikačných krokoch. Zostatkové aktivity sú vyjadrené ako percentá pôvodnej enzymovej aktivity v surovej EMF (8 ml). Purifikačné faktory sú založené na špecifických aktivitách.

Purifikačný krok	Výťažok		Špecifická aktivita (pkat/mg)	Zostatková aktivita (%)	Purifikačný faktor (krát)
	Proteín (mg)	Aktivita (pkat)			
Surová EMF	85.2	384.25	4.51	100.00	1.00
CM-Sephadex C-50	1.01	19.14	18.99	4.98	4.21
ConA - Sepharose	0.15	6.15	40.19	1.60	8.91
Superdex 75	0.01	3.99	475.39	1.04	105.41



Obr. 1. SDS-PAGE prečistenej α -galaktozidázy z A-CF a B-EMF.

Napriek približne rovnakému purifikačnému faktoru pre α -galaktozidázu z CF a EMF (Tab. 1, 2), SDS-PAGE ukázalo, že enzym z CF bol čistejší ako z EMF. α -Galaktozidáza bola identifikovaná ako proteínová zóna s Mh okolo 130 kDa na základe aktivitného stanovenia vo frakciách kalibrovanej kolóny Superdex 75 (Obr. 2).



Obr. 2. Gélová filtrácia na kalibrovanej kolóne Superdex 75 prečistenej α -galaktozidázy z CF (●) a EMF (○).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

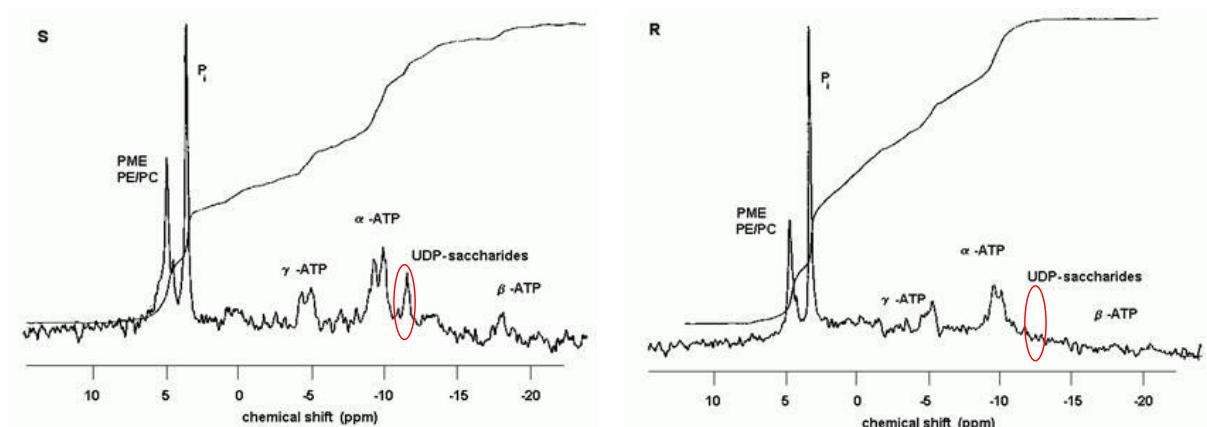
- Ankel H., Ankel E., Schutzbach J. S., Garancis J. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**:3945
- Moyrand F., Fontaine T., Janbon G. (2007) *Mol. Microbiol.* **64**:771
- Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**:475
- Yanagisawa K., Resnick D., Abeijon C., Robbins P.W., Hirschberg C.B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:19351
- Zaragoza O., Telzak A., Bryan A. R., Dadachova E., Casadevall A. (2006) *Mol. Microbiol.* **9**:67

Zvýšená expresia P-glykoproteínu v leukemických bunkách je spojená so zmenami v glykozylácii proteínov.

Zdena Sulová, Tatiana Bubenčíková, Mário Šereš, LENKA GIBALOVÁ, ALBERT BREIER

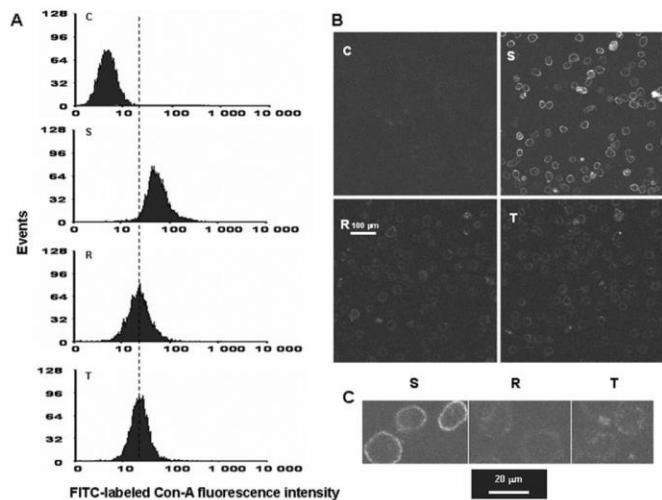
¹Ustav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Vlárská 5. 83334 Bratislava

P-glykoproteín (P-gp) je integrálny glykoproteín plazmatickej membrány, ktorý plní funkciu efluxnej pumpy a je ABCB1 členom rodiny ABC transportérov. Jeho expresia v neoplastických bunkách vedie k rozvoju viaciekovej rezistencie a k zlyhávaniu chemoterapie. Zvýšená expresia tohto proteínu v leukemických bunkách L1210 je sprevádzaná výraznými zmenami v regulácii syntézy glykoproteínov. Pomocou ^{31}P -NMR sme detekovali pokles hladiny ATP a UDP-cukrov v P-gp pozitívnych bunkách (obr.1.).



Obrázok 1. ^{31}P NMR sektrá senzitívnych a rezistentných buniek (S-senzitívne bunky L1210) Rv-rezistentné bunky kultivované v prítomnosti vinkristínu 0.2 mg/l) **PME** - fosfomonoester; **PL/PC** – fosfoetanolamín/fosfocholín, **P_i** – anorganický fosfát, α , β , γ - **ATP** - tri ATP fosfátové skupiny v α , β a γ polohe.

Pozorovali sme aj znížený obsah glykoproteínov interagujúcich s lektínom ConA a aj nižšiu hladinu glykogénu, v porovnaní s P-gp negatívnymi bunkami L1210. Na základe interakcie s rôznymi lektínnimi (ConA, LEA) sme zistili, že expresia P-gp vedie k remodelácii povrchových sacharidov. Expressia P-gp v membráne výrazne znižuje vazbu lektínu ConA nezávisle od či bola expresia P-gp navodená adaptáciou na vinkristín (R) alebo transfekciou s ľudským génom kódujúcim P-gp (T). (obr.2)



Obrázok 2. Detekcia vazby ConA na S,R a T bunky pomocou flurescenčnej cytometrie a v konfokálnom mikroskope.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vdľaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Reactive oxygen species, oxidative liver cells injury and protective effect of pyridoindole derivative stobadin.

Bezek Š., Račkova L., Kyselova Z.

Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology Slovak Academy of Sciences,
Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava.

Increasing evidence in both experimental and clinical studies suggests that reactive oxygen generation play a major role in many pathophysiological conditions including neurodegenerative diseases, cancer, diabetes, cardiovascular and respiratory diseases but also in mechanisms of action of environmental toxicants. Oxidative stress caused by reactive species damages cellular DNA, proteins, and lipids and is widely recognized as one of the causes of the development of chronic disease. The study of the mechanisms involved in cell damage mediated by oxidative compounds as well as the evaluation of biomarkers of the cellular defense system in such conditions could greatly help to prevent appearance and development of oxidative stress related diseases.

The aim of the present study was to establish a model of oxidative stress in primary isolated hepatocytes in order to assay the possible protective effect of original pyridoindole derivative stobadin. The biological system of primary hepatocytes isolated from male Wistar rats was exposed for 1 h to an increasing concentration of tert-butylhydroperoxide. Tert-butylhydroperoxide is an organic lipid hydroperoxide analogue, which is commonly used as a pro-oxidant for evaluating mechanisms involving oxidative stress within cells and tissues. Lactate dehydrogenase leakage and thiobarbituric acid reactive substances formation were determined as biomarkers of hepatocytes oxidative stress injury. Double sequential staining with acridine orange and ethidium bromide allowed discriminate the portions of cells dying either by necrosis or apoptotic cells and/or living cells. Under severe conditions of oxidative stress, there was a large excess of reactive oxygen species, thus cells died from necrosis (1.0 mM resp. 2.0 mM of tert-butylhydroperoxide). Meanwhile, under mild conditions (0.5 mM of tert-butylhydroperoxide) level of reactive oxygen species caused cell death mainly by apoptosis.

The results showed that pretreatment of hepatocytes with stobadine 5 min prior to administration of tert-butylhydroperoxide substances significantly decreased lactate dehydrogenase leakage and thiobarbituric acid reactive substances formation. These protective effects of stobadine against tert-butylhydroperoxide induced oxidative injury were concentration-dependent.

In conclusion, stobadin seemed to be a promising agent for further studies relevant to reactive oxygen species induced functional and structural impairments within cells and tissues. Primary isolated rat hepatocytes as a biological model used in this study corresponds with possible pathophysiological consequences of different liver diseases, thus might serve for prescreening testing of toxic effects for novel substances.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Charakterizácia fosforylačných miest v Ire1

DROPOPOVA M.¹, SESTAK S.¹, SCHROEDER M.², MUCHA J.¹

¹Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, Bratislava, Slovakia

²School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, Durham, United Kingdom

Akumuláciou nesprávne foldovaných alebo poškodených proteínov v lumene endoplazmatického retikula dochádza k aktivácii signálnej dráhy (UPR), ktorej súčasťou je Ire1 transmembránový proteín nevyhnutný pre udržanie rovnováhy endoplazmatického retikula. Oligomerizácia Ire1 aktivuje cytoplazmatickú kinázovú a RNázovú doménu a následne dochádza k nekonvenčnému mRNA zostrihu HAC1 mRNA. Odstránenie intróna a ligácia oddelených exónov vytvorí zostrihnutú formu HAC1 mRNA, ktorá je preložená do Hac1 transkripčného faktora. Pretože nezostrihnutá forma mRNA HAC1 nie je preložená, pokial nedôjde k odstráneniu intróna, RNázová aktivita Ire1 ponúka mechanizmus ako možno prepínať UPR signálnu dráhu. V práci sa zaoberáme prípravou série alanínových mutantov Ire1 zodpovedných za vytvorenie aktívneho komplexu s ligandami a štúdiom ich fenotypu, teda schopnosti adaptácie na stresové podmienky.

Ire1 proteín ma štruktúru tvorenú tromi doménami. Prvá doména nachádzajúca sa v lumene endoplazmatického retikula má schopnosť detegovať nesprávne foldované proteíny. Druhá doména nachádzajúca sa v cytoplazme endoplazmatického retikula je prepojená transmembránovým linkerom. Je to atypická serin/treonin kinázova doména, ktorá sa po aktivácii autofosforyluje v trans polohe. Tretia doména, ktorá tvorí C-terminálny koniec je endoribonukleová doména. Autofosforyláciou sa aktivuje RNázová aktivita Ire1, ktorá následne iniciuje k odstráneniu 252-nukleotidoveho intrónu mRNA kodujucej Hac1, ktorý reguluje transkripciu cielových génov signálnej dráhy UPR. Sú známe tri hlavné miesta zúčastňujúce sa autofosforylácie. Jedná sa o linker doménu, aktivačnú slučku a inzerčnú slučku v kinázovej doméne. Na základe poznatkov iných proteínových kináz (Nolen a kol., 2004) vieme poukázať na päť možných fosforylačných miest v aktivačnej slučke (S837, S840, S841, T841 a S850), ktoré sa podieľajú na formovaní aktívnej kinázovej konformácie. Pomocou cielenej mutagenézy sme pripravili sériu mutantov S837A, S840A, S841A, T844A a S850A a kombinácie mutantov S840A-S841A, S841A-T844A, T844A-S850A a viacnásobného mutanta S840A-S841A-T844A-S850A (QA) Ire1p zodpovedných za vytvorenie aktívneho komplexu s ligandami. V práci sa zaoberáme štúdiom ich fenotypu, teda schopnosti adaptácie na stresové podmienky v prítomnosti 0,4-1,5 µg/ml tunikamycínu (Tm), 1,5-2,5 mM dithiothreitolu (DTT) a 2-3 mM 2-deoxyglukozy (DG). Na základe výsledkov môžeme tvrdiť, že seríne mutany S841A a T844S, ako aj dvojitý serínový mutant S840A-S841A sú citlivejšie na stres endoplazmatického retikula. Trans-autofosforylácia aktivovaných serínových zvyškov S840 a S841 je nevyhnutná pre signálnu dráhu. Ak serín S840 a S841 nemôže byť fosforylovaný, ako v prípade dvojitého mutanta S840A-S841 je v podstate vylúčená UPR signalizácia. Konformačné zmeny vyvolané fosforyláciou sú často stabilizované interakciami medzi novými susednými aminokyselinami, preto aminokyseliny aktivačnej slučky iné ako fosforylované S840, S841 a T844 môžu zohrávať významnú úlohu pri konformačných zmenách dôležitých pre RNázovú aktiváciu.

Nolen B., Taylor S., Ghosh G.. **Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation.** Mol. Cell, vol. 15 (2004), pp. 661-675

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Cloning, expression and biochemical characterization of three putative lysosomal α -mannosidases from *Drosophila melanogaster*

S. Šesták,^a D. Rendić,^b I. Nemčovičová,^{c,a} M. Plšková,^a I. B. H. Wilson^b and J. Mucha^a

^aDepartment of Glycobiology, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

^bDepartment für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien, Austria

^cDepartment of Cellular Biology, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 Athena Circle, La Jolla, CA 92037, USA

Mannosidases are ubiquitous in eukaryotic cells; based on primary sequence homologies, they can be classified into two major classes, the calcium-dependent class I (glycohydrolase family 47) and class II (glycohydrolase family 38), involved in glycan processing and degradation. Defects in the class II lysosomal α -mannosidase, LM (EC 3.2.1.24) cause the lysosomal storage disease, α -mannosidosis. There are six loci encoding putative class II mannosidases in *Drosophila melanogaster*. We have cloned cDNA encoding three homologues of putatively lysosomal mannosidases (assigned LM408, LM250, and LM251). When expressed in *Pichia pastoris*, they were found to encode enzymes that could cleave chromogenic *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside with K_m values in the millimolar range as well as, in three cases, natural oligomannosidic glycans. The enzyme characterization have shown broad temperature and pH tolerance with optima in the range of 40-50 °C and pH 5.0-5.6. All three enzymes were inhibited by swainsonine and mannostatin A with increased IC₅₀ and K_i in the order LM408<LM407<LM252. Thus, unlike mammals, the fruitfly possesses multiple lysosomal mannosidases with similar properties.

Lysosomal mannosidase is a acidic exoglycosidase that cleaves nonreducing terminal α 1,2-, α 1,3- and α 1,6- linked mannose residues of glycoproteins. Together with other glycosidases and proteases is responsible for protein degradation in lysosomes. An enzyme deficiency leads to the lysosomal storage disease, α -mannosidosis, characterized by glycan accumulation. In the case of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, there is only limited data regarding its mannosidases. As regards class II mannosidases, the Golgi mannosidase II has been intensively investigated and its 3D-crystal structure solved; however, there is no published biochemical data as regards the natural substrate specificity of this enzyme and other seven class II mannosidases from the fly. In our work we exploit the *Pichia* expression system in order to characterise selected mannosidases from the fruitfly.

Šesták S, Rendić D, Nemčovičová I, Plšková M, Wilson IBH and Mucha J. Cloning, expression and biochemical characterization of class II α -mannosidases from *Drosophila melanogaster*. *In preparation*.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of *Drosophila melanogaster* lysosomal α -mannosidase

I. Nemčovičová,^{a,b*} M. Nemčovič,^b S. Šesták,^b M. Plšková,^b I. B. H. Wilson^c and J. Mucha^b

^aDepartment of Cellular Biology, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, 9420 Athena Circle, La Jolla, CA 92037, USA

^bDepartment of Glycobiology, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

^cDepartment für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien, Austria

The lysosomal α -mannosidases are class II mannosidases that belong to glycoside hydrolase family 38 and play an important role in the degradation of asparagine-linked carbohydrates of glycoproteins. Based on peptide similarity to human and bovine lysosomal mannosidase (LM), recombinant α -mannosidase from *Drosophila melanogaster* (dLM408) was cloned and heterologously expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant form of dLM408 designed for structural analysis lacks the transmembrane domain and was crystallized using standard vapour-diffusion and counter-diffusion techniques. The crystals grew as flat plates and as tetragonal bipyramids, respectively. The plate-shaped crystals exhibited the symmetry of space group $P2_12_12_1$ and diffracted to a minimum *d*-spacing of 3.5 Å.

Most extracellular proteins contain asparagine-linked (N-linked) oligosaccharides as a result of post-translational modification which is essential for their proper function.

Mannosidases involved in the biosynthesis and catabolism of N-glycans have been divided into several broad classes based on sequence comparisons, specificity for substrates and other characteristics. Lysosomal α -mannosidase (LM; EC 3.2.1.24) is a major exoglycosidase in the glycoprotein degradation pathway. To date only one protein structure of lysosomal mannosidase (cloned from *B. taurus*) has been solved.

Here, we report our recent findings on *D. melanogaster* lysosomal mannosidase dLM408, including its characterization, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis. We have shown that the dLM408 is an approximately 132 kDa enzyme with characteristics similar to those of other enzymes in the GH38 α -mannosidase family. One of the crystal forms offered promising structural data, while structural analysis at 3.5 Å resolution and the optimization of the second crystal form are currently underway. The successful crystallization and determination of the dLM408 structure in its active form will help in understanding the catalytic processes of α -mannosidase family.

Nemčovičová I, Nemčovič M, Šesták S, Plšková M, Wilson IBH and Mucha J. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of *Drosophila melanogaster* lysosomal α -mannosidase. (2012). *Acta Cryst. F68*, 965–970

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for Glycomics, ITMS 26240120031, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Indukcia α -galaktozidázy kmeňa *Cryptococcus laktózou*

Eva Stratilová, Renáta Vádkertiová, Jana Guthová a Ján Mucha*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko;

*chemjmuc@savba.sk

Kľúčové slová: *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, α -galaktozidáza, laktóza

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Moyrand a kol. (2007) zistili, že velkosť kapsuly a jej zbalenie závisia na vzájomnom pôsobení základných polysacharidových zložiek, GXM (glukuronoxylomanán) a GalXM (galaktoxylomanán). Mutant, ktorý neboli schopný syntetizovať GalXM mal väčšiu kapsulu, ako pôvodný divý kmeň. Z tohto sa predpokladalo, že na neprítomnosť GalXM bunka reaguje nadprodukciou molekúl GXM, čo má za následok zväčšenie kapsule. Tento fakt poukazuje na dôležitosť metabolizmu galaktózy v zachovaní štruktúry a veľkosti kapsuly.

Jedným z enzymov, ktorý by mohol prispievať k metabolizmu galaktózy, je α -galaktozidáza. Experimenty, ktoré boli z dôvodu menšej patogenity robené s *C. laurentii*, poukázali na jednej strane na výraznú indukcii tohto enzymu zdrojom uhlíka média, ktorý obsahoval viazanú galaktózu, na druhej strane však porovnávacie štúdie s genómom *C. neoformans* poukázali na fakt, že táto indukovateľná α -galaktozidáza má vyššiu podobnosť s fungálnymi enzymami ako s potencionálnou α -galaktozidárou [Loftus a kol., 2005]. Aby sa aspoň nepriamo potvrdila funkcia indukovateľnej α -galaktozidázy pri prestavbe kapsule, musela by byť produkovaná aj silne patogénnymi kmeňmi *C. neoformans*.

Materiál a metódy

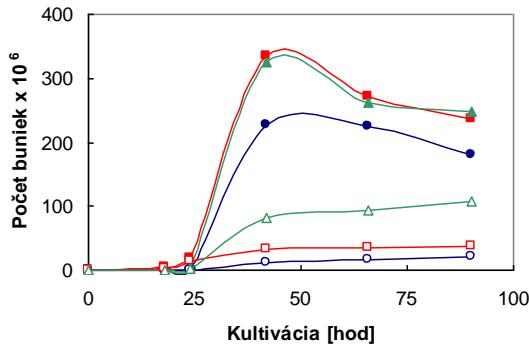
Kmene *C. laurentii* CCY 17-3-29 a *C. neoformans* CCY 17-1-2 (sérotyp D ako JEC21; Loftus a kol., 2005) a CCY 17-1-8 (sérotyp A so stanovenou povrchovou aktivitou α -galaktozidázy; Maceková a kol., 2006) pochádzali zo Zbierky kvasiniek CHÚ SAV. Kultivácia prebiehala na semisyntetickom médiu s 2% laktózou alebo 2% glukózou ako zdrojom uhlíka. V priebehu kultivácie sa sledoval rast mikroorganizmov a produkcia povrchovej α -galaktozidázy.

Rast mikroorganizmov bol vyhodnotený počítaním buniek v Burkerovej komôrke pod mikroskopom.

α -Galaktozidázová aktivita bola stanovená pri 37 °C na PNP- α -galaktopyranozid ako substrát. Reakčná zmes bola zložená z 50 µl média s bunkami, 175 µl 0,1 M citrát-fosfátového tlmiivého roztoku pH 4,8 a 50 µl substrátu. Reakcia bola zastavená po 30 min prípadkom 4% Na₂CO₃ a po odcentrifugovaní buniek a extracelulárnych polysacharidov (10000 x g; 10 min) bolo množstvo uvoľneného PNP stanovené meraním absorbancie pri 410 nm.

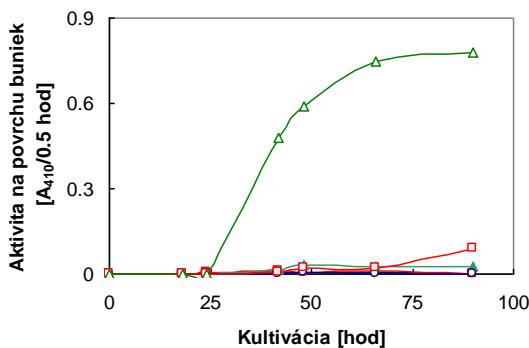
Výsledky a diskusia

Výsledky experimentu týkajúceho sa rastu kmeňov rodu *Cryptococcus* v médiách s obsahom glukózy a laktózy ako C-zdroja, sú znázornené na Obr. 1. Ako z nich vyplýva, všetky tri kmene rástli na laktózových médiach niekol'konásobne pomalšie, ako na médiách s glukózou.



Obr. 1: Rast kmeňov *C. laurentii* CCY 17-3-29 (zelená) a *C. neoformans* CCY 17-1-2 (modrá) a CCY 17-1-8 (červená) na médiu s obsahom 2% glukózy (plné znaky) a 2% laktózy (prázdne znaky).

Indukcia α -galaktozidázy laktózou sa potvrdila výlučne u kmeňa *C. laurentii*. Kmene *C. neoformans* tento enzym produkovali v zanedbateľnom množstve (Obr. 2) a jeho tvorba nebola ovplyvnená prítomnosťou laktózy v kultivačnom médiu.



Obr. 2: Produkcia povrchovej α -galaktozidázy v priebehu rastu kvasiniek *C. laurentii* CCY 17-3-29 (zelená) a *C. neoformans* CCY 17-1-2 (modrá) a CCY 17-1-8 (červená) na médiu s obsahom 2% glukózy (plné znaky) a 2% laktózy (prázdne znaky).

Z týchto výsledkov vyplýva, že produkcia indukovanateľnej α -galaktozidázy nie je pre rod *Cryptococcus* univerzálnym javom, a preto nemôže vo všeobecnosti ovplyvňovať rearanžovanie polysacharidových kapsúl tohto rodu. Okrem toho bola analogická indukcia tohto enzymu popísaná aj v prípade iných eukaryotických (nekapsulárnych) mikroorganizmov ako napr. *Trichoderma reesei* [Zeilinger et al., 1993], ktorá však na rozdiel od *C. laurentii* produkovala aj extracelulárnu α -galaktozidázu. Ďalším

rozdielom bola indukcia α -galaktozidázy *T. reesei* galaktózou, korá v prípade *C. laurentii* pozorovaná nebola.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Loftus B.J., Fung E., Roncaglia P. a kol. (2005) *Science* **307**:1321
Maceková D. Farkaš V., Kishida E., Takeo K. (2006) *J. Basic Microbiol.*, **46**: 470
Moyrand F., Fontaine T., Janbon G.(2007) *Mol.Microbiol.* **64**:771
Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriol.* **284**:475
Zeilinger S., Kristufek, D., Arisan-Atac I., Hodits R., Kubicek Ch. P. (1993) *App. Environm. Microbiol.*, **59**: 1347

Kryštalizácia glukoamylázy Gla zo *Saccharomycopsis fibuligera*

Ľubica Urbániková, Eva Hostinová a Juraj Gašperík

Ústav molekulárnej biológie, Slovenská akadémia vied, 845 51 Bratislava, Slovensko

Kľúčové slová: kryštalizácia, glukoamyláza, *Saccharomycopsis fibuligera*

Glukoamylázy z variantných kmeňov potravinárskej kvasinky *Saccharomycopsis fibuligera* sú dobrým objektom pre sledovanie vzťahov medzi štruktúrou a funkciou. Sú to enzýmy katalyzujúce odštiepovanie molekúl alfa-D-glukózy z neredukujúceho konca škrobu a maltooligosacharidov.

Súbor štyroch relatívne dobre charakterizovaných enzýmov s vysokým stupňom homológie v primárnej štruktúre (*Glu/S. fibuligera* HUT7212, *Gla/S. fibuligera* KZ, *GLL/S. fibuligera* 64, *Glm/S. fibuligera* IFO 0111) umožňuje doteraz sledovať zmenu ich fyzikálno-chemických vlastností len na úrovni modelov odvodených od 3D štruktúry glukoamylázy Glu [1].

Všetky štyri glukoamylázy majú na svojom povrchu skupinu piatich aminokyselinových zvyškov tvoriacich tzv. "sugar tongs", pomocou ktorej sa adsorbujú na surový škrob.

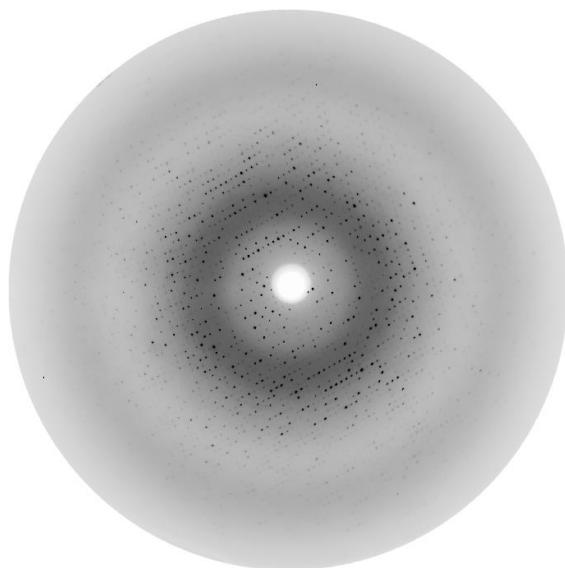
Medzi najmarkantnejšie odlišnosti patrí špecifická aktivita, tepelná stabilita, schopnosť len jednej z týchto glukoamyláz (*Glm* z *S.fibuligera* IFO 0111) štiepiť surový škrob, resp. mimoriadne dobrá renaturácia po tepelnej denaturácii v prípade glukoamylázy Gla (produkowanej kmeňom *S. fibuligera* KZ) [2,3].

V snahe obísť problémy s mikroheterogenitou spôsobenou nešpecifickou glykozyláciou glukoamylázy z pôvodného producenta sme pripravili rekombinantnú glukoamylázu Gla expresiou v *Escherichia coli*. Jej izoláciu z inkluzánych teliesok a následnú purifikáciu sme realizovali za podmienok vylučujúcich naviazanie sa molekúly Tris do aktívneho miesta kde pôsobí ako inhibítorky.

Doposiaľ bola určená terciárna štruktúra glukoamylázy Glu s naviazanou molekulou Tris (rozlíšenie 1.7 Å a 1.1 Å) a akarbózou (rozlíšenie 1.6 Å), ktoré pôsobia ako jej inhibítory [1,4]. Napriek tomu, že identita glukoamyláz Glu a Gla je vyše 98% (lišia sa iba siedmimi aminokyselinami z celkového počtu 492), štruktúru Gla sa nepodarilo určiť, pretože pripravené kryštály boli zdvojčatené.

Napriek počiatočným neúspechom sme v kryštalizácii pokračovali. Kryštály Gla, ktoré difraktovali s rozlíšením 1.8 Å boli pripravené metódou difúzie cez plynnú fázu vo visiacej kvapke s použitím 30% PEG 8K v 100 mM octanovom pufri, pH 5.5, ako pomocného roztoku. Kvapka s objemom 2µl bola pripravená zmiešaním roztoku proteínu, pripraveného rozpustením lyofilizovanej vzorky vo vode do konečnej koncentrácie 20 mg/ml, a pomocného roztoku v pomere 1:1. Na rozdiel od predchádzajúcich pokusov, kedy proteín kryštalizoval v priebehu 4-6 týždňov, v prípade Gla kryštály sa vytvorili až po niekoľkých mesiacoch z pomerne hustej zrazeniny. Získané kryštály boli monoklinické, priestorová grupa $P2_1$ s mriežkovými parametrami $a=66.5$, $b=81.5$, $c=83.4$ Å, $\beta=109.94^\circ$. V asymetrickej jednotke sa nachádzajú dve molekuly proteínu. Pre porovnanie, kryštály Glu boli ortorombické s priestorovou grupou $P2_12_12_1$, mriežkovými parametrami $a=66.5$, $b=81.5$, $c=83.4$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ a jednou molekulou proteínu v asymetrickej jednotke [5].

Difrakčné dátá boli zmerané pomocou synchrotronového žiarenia na X13 beamline v EMBL, c/o DESY, Hamburg. Difrakčný obrazec je na Obr. 1. Po spracovaní sme získali súbor dát s kompletnosťou 95%, pričom pre dátá s najvyšším rozlíšením (1.80-1.86 Å) bola kompletnosť 98%, multiplicita meraní 2.78 a R_{merge} 34%. Štruktúra je v štádiu riešenia. Napriek tomu, že neočakávame výrazné rozdiely medzi terciárhou štruktúrou glukoamyláz Glu a Gla, predpokladáme, že porovnanie oboch štruktúr by mohlo prispieť k vysvetleniu ich odlišných fyzikálno-chemických vlastností.



Obr. 1. Difrakčný obrazec z kryštálu glukoamylázy Gla. Rozlíšenie na okraji obrazca je na úrovni 1.77 Å (difrakcie detegovateľné počítačom).

Poděkování: Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a vedeckým grantom VEGA 2/0189/11.

Ďakujeme EMBL, c/o DESY, Hamburg za umožnenie zberu difrakčných dát na synchrotróne a technickú podporu.

Literatúra:

1. Ševčík J, Solovicová A, Hostinová E, Gašperík J, Wilson KS, Dauter Z (1998) Acta Cryst. D54: 854-866
2. Gašperík J, Hostinová E (1993) Curr. Microbiol. 27, 11-14
3. Hostinová E, Solovicová A, Dvorský R, Gašperík J, (2003) Arch. Biochem. Biophys. 411, 189-198
4. Ševčík J, Hostinová E, Solovicová A, Gašperík J, Dauter Z, Wilson KS (2006) FEBS J. 273: 2161-2171.
5. Solovicová A, Gašperík J, Ševčík J, Hostinová E (1997) Acta Cryst. D53, 782-783

